

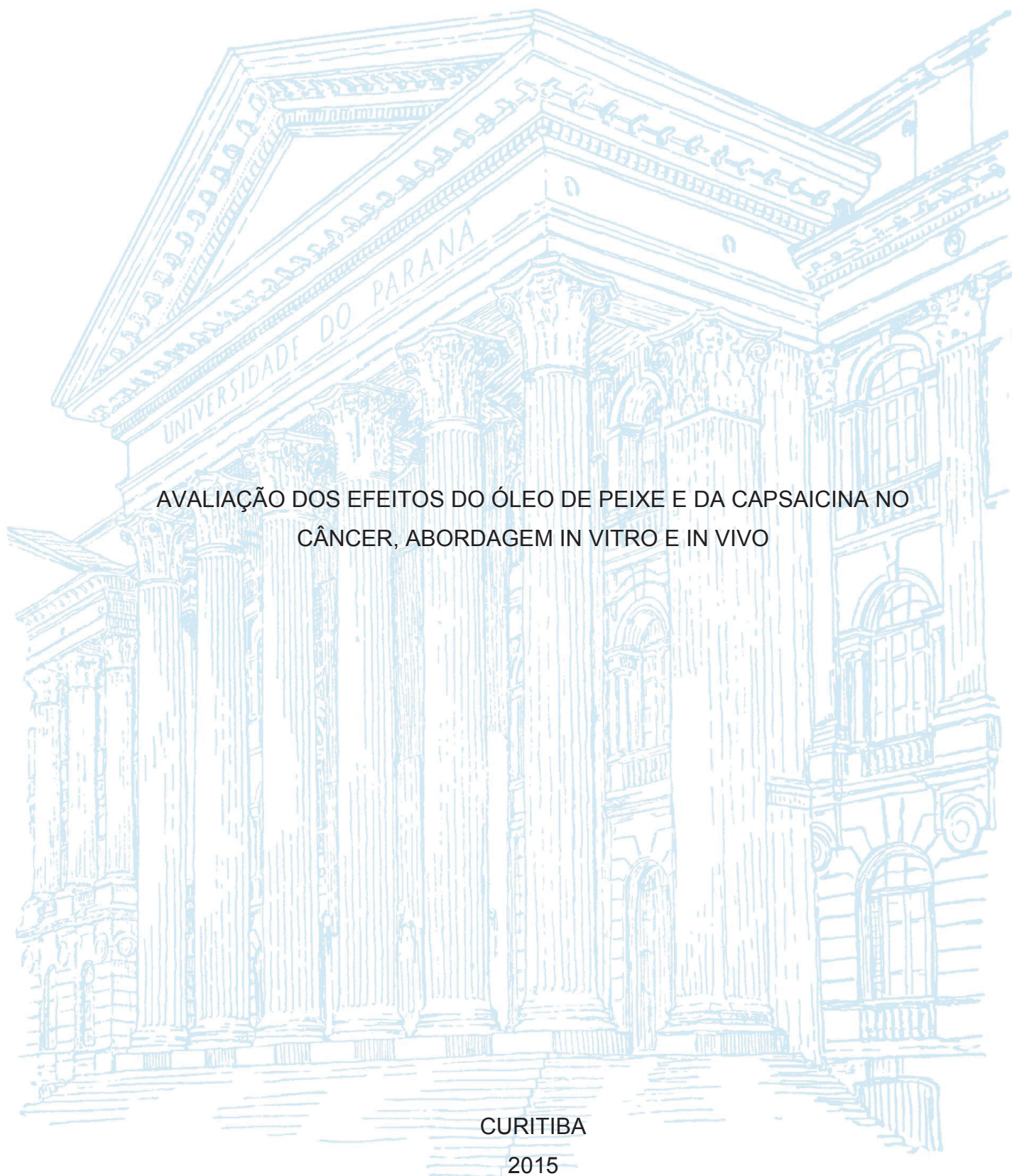
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SERGIO RICARDO DE BRITO BELLO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO DE PEIXE E DA CAPSAICINA NO
CÂNCER, ABORDAGEM IN VITRO E IN VIVO

CURITIBA

2015



SERGIO RICARDO DE BRITO BELLO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO DE PEIXE E DA CAPSAICINA NO
CÂNCER, ABORDAGEM IN VITRO E IN VIVO

Tese apresentada ao curso de Pós Graduação
em Medicina Interna, Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Doutor
em Medicina Interna

Orientadora: Prof.(a) Dra. Iara Messias Reason
Coorientador: Prof. Dr. Luis Claudio Fernandes

CURITIBA

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA
JORDÃO CRB 9/991 COM OS DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

B446 Bello, Sérgio Ricardo de Brito
Avaliação dos efeitos do óleo de peixe e da capsaicina no câncer,
abordagem in vitro e in vivo [recurso eletrônico] / Sérgio Ricardo de Brito
Belo. – Curitiba, 2014.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina
Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do
Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Iara Messias Reason

Coorientador: Prof. Dr. Luis Claudio Fernandes

1. Neoplasias. 2. Óleos de peixe. 3. Capsaicina. 4. Apoptose.
I. Reason, Iara Messias. II. Fernandes, Luis Claudio. III. Programa de
Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde.
Universidade Federal do Paraná. IV. título

NLMC: QZ 200



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
= MESTRADO e DOUTORADO =

PARECER

Aos dezanove dias do mês de dezembro do ano de dois mil e quatorze, a banca examinadora constituída pelos Professores: Dra. Flávia Alessandra Guarnier (UEL), Dra. Dorly de Freitas Buchi (UFPR – Departamento de Biologia Celular), Dr. Ricardo Antonio Tanhoffer (UFPR) Dra. Fabiola Iagher (UFPR – Departamento de Fisiologia), Dra. Iara José de Messias-Reason (UFPR) – orientadora, exarou o presente parecer sobre a tese elaborada por **SERGIO RICARDO DE BRITO BELLO** do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna - Doutorado da Universidade Federal do Paraná, intitulada: “**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO DE PEIXE E DA CAPSAICINA NO CÂNCER, ABORDAGEM *IN VITRO* E *IN VIVO***”. A Banca examinadora considerou que o aluno apresentou trabalho adequado para tese e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação** sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título **de Doutor em Medicina Interna**. A banca considerou o trabalho de grande relevância à Saúde Pública, e recomendam a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas às sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Professora Dra. Flávia Alessandra Guarnier

Professora Dra. Dorly de Freitas Buchi

Professor Dr. Ricardo Antonio Tanhoffer

Professora Dra. Fabiola Iagher

Professora Dra. Iara José de Messias-Reason

“Este trabalho é dedicado a meu pai, ao meu melhor amigo que sempre esteve ao meu lado ao longo dessa jornada. Mesmo distante do plano terrestre, ainda assim sinto o seu amor por onde quer que eu ande. Levarei comigo seus princípios, sua personalidade e nossas memórias. Te amo pai.”

AGRADECIMENTOS

A minha mãe **Maria Lina de Brito Belo** pelo amor incondicional, eterno e transcendental, inabalável, compreensivo e permeado pela graça de Deus. Nos meus primeiros passos você sempre esteve presente, acreditou nos meus sonhos, compreendeu minhas dificuldades e agora, minhas vitórias são suas.

Ao meu querido pai **José Pires Belo**. Não existe um só momento que eu não me lembre do senhor, não existe saudade maior que esta, nem mesmo maior felicidade por ter sido seu filho, meu querido português do Barrete dos abraços apertados. Obrigado pelas caronas, pelo “*meu garoto*”, obrigado pelo seu carinho, pela sua inteligência inexorável, pela dedicação a família, pelas viagens...

A minha querida esposa e companheira **Jenniffer Priscila Pereira Fontes**, por me amar com olhares, atitudes e poucas palavras. Aos meus irmãos André e Marcelo pelo companheirismo, pela amizade, pelas brincadeiras, pelo apoio e principalmente por vocês fazerem parte de minha VIDA.

A minha orientadora professora Dra. **Iara Messias Reason** pela motivação, apoio, amizade e oportunidade. Sua presença realmente fez a diferença em minha vida. Quando Deus coloca pessoas em minha vida como a senhora, tenho ainda mais certeza de seu amor.

Ao meu querido coorientador professor Dr. **Luis Claudio Fernandes** pela oportunidade de vivenciar a pesquisa em uma Universidade Federal, especialmente por fazer parte da história do Labmetab e compreender o quanto o conhecimento nos torna humildes diante de tantas possibilidades. Desde 2005 o Labmetab tornou-se minha segunda casa. Eternamente serei grato ao professor Luis Claudio Fernandes.

Aos amigos e colaboradores **Raciele Guarda, Ricardo e Aldre Tanhoffer, Dagliane, Tiago Reis, Paola, Maisa, Daniele Pequito, Adriana Yamagushi, Sandro, Isabela Coelho, Caroline**. Obrigado pelas conversas Aldre, vc e o Rica realmente formam um casal especial.

Ao biotério da Universidade Federal do Paraná. Em especial as funcionárias **Gilmara, Luana e Isele** e demais funcionários pela proatividade, e apoio na execução da presente tese.

A todos os animais, meu muito obrigado!

A professora **Katya Naliwaiko** pela ajuda incalculável nos cálculos (trocadilho) e ainda por todo apoio ao longo dessa jornada. No meio de tantas atividades, vc sempre se mostrou comprometida com o lab.

A **Nilce Folle** pela ajuda imensurável, pelo apoio moral, pelas conversas. Você é parte importante desse processo, vc faz parte de minha família.

A Universidade Federal do Paraná por ter me dado à possibilidade de crescer profissionalmente. Agradeço a todos os professores e técnicos.

Em especial ao setor de pós-graduação em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná. **A Valéria, ao professor Dr. Helio.**

Às Professoras **Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco, Dra. Almerine Maria Weffort Santos** e **Dra. Gláucia Regina Martinez**, pelo fornecimento das linhagens tumorais.

À Professora **Dra. Flávia Alessandra Guarnier-UEL** pela doação das células de Tumor de Walker 256.

Aos amigos de Registro: Todos vcs tornaram essa jornada mais alegre.

**“ Há uma força motriz mais poderosa que o vapor,
a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”**

Albert Einstein

RESUMO

Introdução: Modificações no padrão dietético ocorridas nos últimos 200 anos promoveram redução no consumo de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) n-3, elevação no consumo de gordura total, saturada e rica em AGPI n-6. Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) n-3, em especial o ácido graxo eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), desempenham diferentes efeitos na prevenção do câncer e/ou redução do tumor, menor proliferação das células tumorais e maior peroxidação lipídica. Em adição, atenuam os efeitos da caquexia oncológica e modulam a resposta imunológica. Entretanto, a investigação dos efeitos biológicos do óleo de peixe combinado com outras substâncias de interesse biológico ainda é insuficiente para o delineamento de condutas combinadas para o paciente oncológico. A capsaicina ou 8-metil-N-vanilil 1-6 nonamida, nos últimos dez anos tem sido considerada uma substância promissora, uma vez que seus efeitos sugerem propriedades antitumorais pela indução da apoptose, evento esse fundamental no controle da disseminação de células tumorais. **Objetivo:** Avaliar o efeito isolado e combinado da suplementação com óleo de peixe e capsaicina sobre o tumor de Walker 256 e em linhagens tumorais. **Metodologia:** Para a abordagem *in vivo* utilizamos o modelo do tumor de Walker 256, sendo avaliados: parâmetros de caquexia, crescimento tumoral, resposta leucocitária e função renal e hepática. Para a abordagem *in vitro* foram utilizadas 4 linhagens celulares: B16F10 (melanoma murino), HeLA (câncer de colo do útero), McCoy (Fibroblasto murino) e HepG2 (hepatocarcinoma humano), sendo avaliadas proliferação, viabilidade, apoptose e necrose. **Resultados:** O óleo de peixe e a capsaicina, isolados ou combinados reduziram significativamente a massa e a proliferação tumoral. Tanto o ômega 3 isolado, quanto combinado com a capsaicina promoveram ganho de massa corporal no período de indução tumoral; aumento no percentual de células apoptóticas e ainda, efeito anti-caquexia. As funções hepáticas e renais em todos os grupos suplementados e tratados foram preservadas. O óleo de peixe e a capsaicina, isolados ou associados reduziram a proliferação linfocitária e promoveram aumento na população dos linfócitos TCD8+ somente nos animais com tumor. A fagocitose e a produção de ânion superóxido em macrófagos e neutrófilos mostrou-se elevada nos grupos suplementados e tratados; enquanto que a retenção de vermelho neutro apresentou-se diferente entre macrófagos e neutrófilos. Na presença de tumor, somente a capsaicina isolada foi capaz de promover elevação na produção de óxido nítrico. Nos modelos *in vitro* o óleo de peixe e a capsaicina, isolados ou combinados reduziram a proliferação e a viabilidade das linhagens HeLA e HepG2. Óleo de peixe isolado ou associado com a capsaicina promoveu aumento da apoptose das linhagens B16F10, HeLA e HepG2, enquanto que a capsaicina isolada somente foi capaz de aumentar a taxa apoptótica da linhagem HeLA. Interessantemente as suplementações e tratamentos propostos não alteraram a proliferação e a viabilidade da linhagem de fibroblastos murinos, indicando ausência de efeito tóxico sobre células saudáveis. **Conclusão:** Os resultados indicam a possibilidade para o desenvolvimento de uma terapia anti-câncer combinada.

Palavras-chave: Câncer. Óleo de peixe. Capsaicina. Apoptose.

ABSTRACT

Introduction: Changes in dietary pattern in the last 200 years promoted a reduction in the consumption of polyunsaturated fatty acids (PUFA) n-3, high in the consumption of total fat, saturated fat and rich in n-6 PUFA. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) n-3, especially eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) perform different effects on cancer prevention and / or reduction of the tumor, reduced proliferation of tumor cells and increased peroxidation lipid. In addition, mitigate the effects of cancer cachexia and modulate the immune response. However the evidence of the biological effects of fish oil combined with other substances of biological interest is still insufficient for the design of pipelines combined front to cancer patients. Capsaicin or 8-methyl-N-vanillyl nonamide 1-6 in the last ten years has been considered a promising substance, its effects suggest antitumor properties by inducing apoptosis, a key event in controlling the spread of tumor cells. **Objective:** To evaluate the single and combined effect of supplementation with fish oil and capsaicin on cancer models *in vitro* and *in vivo*. **Methodology:** We used *in vivo* model of Walker 256 tumor and evaluated parameters of cachexia, tumor growth, leukocyte response and renal and hepatic function. Four cell lines were used for *in vitro* approach: B16F10 (murine melanoma), HeLa (cervical cancer), McCoy (murine fibroblast) and HepG2 (human hepatocellular carcinoma). **Results:** Fish oil and capsaicin, alone or in combination significantly reduced the tumoral weight and proliferation. Isolated omega 3 or combined with capsaicin promoted body weight gain during tumor induction; increase in the percentage of apoptotic cells and also anti-cachexia effect. The liver and kidney functions in all supplemented and treated groups were preserved. Fish oil and capsaicin, alone or associated reduced lymphocyte proliferation and promoted an increase of CD8 + lymphocytes in the animals with tumor. The phagocytosis and superoxide anion production in neutrophils and macrophages was high in treated and supplemented groups; while neutral red retention differed among macrophages and neutrophils. In the presence of tumor, only isolated capsaicin was able to promote increase in nitric oxide production. *In vitro* models of fish oil and capsaicin, alone or in combination reduced the viability and proliferation of the lines HeLa and HepG2. Fish oil alone or in combination with capsaicin caused increased apoptosis of B16F10 lines, HeLa and HepG2, while the isolated capsaicin was only able to increase the apoptotic rate of the HeLa lineage. Interestingly the supplemental and proposed treatments did not affect the proliferation and viability of the murine fibroblasts strain, indicating no toxic effect on healthy cells. **Conclusion:** These findings may indicate the possibility of development of a combined anticancer therapy.

Keywords: Cancer. Fish oil. Capsaicin. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele e não melanoma	19
Figura 2:	Esquema representativo do ciclo de cori	21
Figura 3:	Tumor sólido de walker 256 após 14 dias de inoculação/ fonte: laboratório de metabolismo celular-ufpr. fotografia: sérgio ricardo de brito belo, 2014.	30
Figura 4:	Microscopia de luz da forma sólida do tumor de Walker 256 transplantada em ratos. visualização de células principais e células indiferenciadas coradas em hematoxilina e eosina.x 100. Agostino & Cliffton, 1968	31
Figura 5:	Imagem de microscopia de luz do fluído peritoneal de um rato portador de tumor ascético de Walker 256. Visualização de células principais coradas em giemsa x 800. Agostino & Cliffton, 1968.	31
Figura 6:	Percentual de calorias ingeridas a partir de gorduras, desde o homem paleolítico até o ano 2000. Fonte: simopoulos (1999).	33
Figura 7:	Metabolização dos agpi n-6 e n-3 (adaptado de calder, 2012)	35
Figura 8:	Estrutura química da capsaicina (<i>trans</i> -8-metil-n-vanilil-6-nonenamida)	39
Figura 9:	Canal trpv1-transient receptor potential vanilloid type-1 ou vr1.fonte: Bautisto & Julius, 2008.	42
Figura 10:	Massa tumoral	63
Figura 11:	Concentração plasmática de lactato	65
Figura 12:	Conteúdo de glicogênio hepático	67
Figura 13:	Glicemia	68
Figura 14:	Triacilglicerolemia	69
Figura 15:	Proliferação de células tumorais in vivo	72
Figura 16:	Proliferação linfocitária	77
Figura 17:	Quantificação de linfócitos CD4+ do linfonodo mesentérico	78
Figura 18:	Quantificação de linfócitos CD8+ do linfonodo mesentérico	80
Figura 19:	Razão CD4+/CD8+ de linfócitos do linfonodo mesentérico	81
Figura 20:	Fagocitose em macrófagos	83
Figura 21:	Retenção de vermelho neutro em macrófagos	84
Figura 22:	Produção de ânion superóxido em macrófagos	86
Figura 23:	Produção de óxido nítrico em animais sem tumor	87
Figura 24:	Produção de óxido nítrico em animais com tumor	88
Figura 25:	Fagocitose em neutrófilos	90
Figura 26:	Retenção de vermelho neutro em neutrófilos	91
figura 27:	Produção de ânion superóxido em neutrófilos	92
figura 28:	Proliferação de células B16f10	97
figura 29:	Proliferação de células Mccoy	97
figura 30:	Proliferação de células HeLa	98
figura 31:	Proliferação de células HepG2	98
Figura 32:	Viabilidade de células B16F10	100
Figura 33:	Viabilidade de células HeLa	100
Figura 34:	Viabilidade de células Mccoy	101
Figura 35:	Viabilidade de células HepG2	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição tecidual de capsaicina administrada em ratos por v.o. (adaptado de suresh & srinivasan, 2010)	41
Tabela 2	Peso corporal(g), peso tumoral(g), peso da carcaça(g) e mudança de peso (g) dos animais sem tumor e com tumor	70
Tabela 3	Resumo dos efeitos das diferentes suplementações sobre os parâmetros de caquexia induzidos pelo tumor de walker 256	71
Tabela 4	Percentual (%) de células apoptóticas, necróticas e viáveis determinado por citometria de fluxo	73
Tabela 5	Concentrações plasmáticas de creatinina e uréia (mg/dL)	93
Tabela 6	Concentrações plasmáticas de AST (Aspartato aminotransferase) e ALT (Alanina aminotransferase)	94
Tabela 7	Percentual (%) de células apoptóticas, necróticas e viáveis determinado por citometria de fluxo, linhagem B16F10	103
Tabela 8	Percentual (%) de células apoptóticas, necróticas e viáveis determinado por citometria de fluxo, linhagem MacCoy	103
Tabela 9	Percentual (%) de células apoptóticas, necróticas e viáveis determinado por citometria de fluxo, linhagem HeLA	103
Tabela 10	Percentual (%) de células apoptóticas, necróticas e viáveis determinado por citometria de fluxo, linhagem HepG2	104

LISTA DE SIGLAS

ARA	Ácido araquidônico
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
ALA	Ácido α -linolênico
ATP	Adenosina trifosfato
Bcl-2	B-cell lymphoma
BSA	Albumina sérica bovina
C	Controle
CD3+	Cluster de diferenciação 3
CD4+	Cluster de diferenciação 4
CD8+	Cluster de diferenciação 8
CEEA	Comite de ética em experimentação animal
ConA	Concanavalina A
COX	Ciclooxygenase
DCNT	Doença Crônica não Transmissível
DHA	Ácido docosahexaenóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EROS	Especies reativas de oxigênio
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FML	Fator mobilizar de lipídios
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
INCA	Instituto Nacional do Câncer
I κ B	Inibidor do Kappa B
IL-1	Interleucina-1
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
INF γ	Interferon gama
LA	Ácido linoléico
LOX	Enzima Lipooxygenase

LPS	Lipopolissacarídeo de parede bacteriana
LT	Leucotrieno
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NK	Linfócitos natural killer
ON	Óxido nítrico
n-3	Ácido graxo da família Ômega-3
n-6	Ácido graxo da família Ômega-6
n-7	Ácido graxo da família Ômega-7
n-9	Ácido graxo da família Ômega-9
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução tampão fosfato salina
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-sigla de meio de cultura celular
SFB	Soro fetal bovino
Th	Linfócitos T auxiliares ou <i>helper</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
7-AAD	7-amino-actinomicina D
Δ	Delta
ω	ômega

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 O Câncer.....	18
1.1.1 Caquexia oncológica.....	20
1.1.2 Câncer e apoptose celular.....	23
1.1.3 Imunologia no câncer.....	25
1.1.4 Modelos experimentais para o estudo do câncer.....	29
1.1.4.1 Tumor de Walker 246.....	29
1.1.4.2 B16F10 (melanoma murinho), HeLa (câncer de colo de útero), McCoy (fibroblastos de camundongo) e HEPG2 (Hepatocarcinoma humano)	31
1.2 NUTRIÇÃO E Câncer.....	33
1.2.1 Ácidos graxos poli-insaturados (AGP n-3)	34
1.2.2 Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e câncer.....	36
1.2.3 Capsaicina.....	38
1.2.4 Capsaicina, câncer e receptores TRPV1.....	41
2. JUSTIFICATIVA.....	45
3. OBJETIVOS.....	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 REAGENTES.....	47
4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS COM MODELO <i>IN VIVO</i>	47
4.2.1 Animais.....	47
4.2.2 Delineamento experimental.....	48
4.2.3 Massa corpórea.....	49
4.2.4 Obtenção e transplante das células do tumor de Walker 256.....	49
4.2.5 Isolamento dos linfócitos dos linfonodos mesentéricos.....	50
4.2.6 Proliferação linfocitária.....	50
4.2.7 Marcadores de superfície.....	51
4.2.8 Apoptose de células tumorais.....	51
4.2.9 Parâmetros imunitários de macrófagos e neutrófilos.....	52

4.2.9.1	Obtenção de macrófagos.....	52
4.2.9.2	Obtenção de neutrófilos.....	52
4.2.9.3	Fagocitose.....	52
4.2.9.4	Retenção de vermelho neutro.....	53
4.2.9.5	Mensuração da produção de ânion superóxido.....	54
4.2.9.6	Adesão de macrófagos.....	54
4.2.9.7	Produção de óxido nítrico por macrófagos.....	55
4.2.10	Determinação dos parâmetros bioquímicos de caquexia.....	55
4.2.10.1	Lactatemia	55
4.2.10.2	Conteúdo de glicogênio hepático.....	56
4.2.10.3	Glicemia.....	57
4.2.10.4	Triacilglicerolemia.....	57
4.2.10.5	Colesterol total.....	57
4.2.11	Parâmetros bioquímicos de função renal.....	57
4.2.11.1	Creatinina plasmática.....	57
4.2.11.2	Uréia.....	57
4.2.12	Parâmetros bioquímicos de função hepática.....	58
4.2.12.1	Aspartato aminotransferase (AST).....	58
4.2.12.2	Alanina Aminotransferase (ALT).....	58
4.3	ENSAIOS BIOLÓGICOS COM MODELOS <i>IN VITRO</i>	58
4.3.1	Manutenção das linhagens tumorais.....	58
4.3.2	Complexação do óleo de peixe a albumina.....	59
4.3.3	Ensaio com linhagens tumorais.....	59
4.3.4	Proliferação celular pela incorporação de timidina radiomarcada....	59
4.3.5	Viabilidade celular por MTT.....	60
4.3.6	Marcação necrose/ Apoptose.....	60
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	EXPERIMENTAÇÃO “ <i>IN VIVO</i> ”	61
5.1.1	Massa tumoral.....	63
5.1.2	Concentração plasmática de lactato.....	65
5.1.3	Conteúdo de glicogênio hepático.....	67
5.1.4	Glicemia.....	68

5.1.5	Triacilglicerolemia.....	69
5.1.6	Proliferação de células tumorais in vivo.....	72
5.1.7	Proliferação linfocitária.....	77
5.1.8	Quantificação dos linfócitos CD4+ do linfonodo mesentérico.....	78
5.1.9	Quantificação dos linfócitos CD8+ do linfonodo mesentérico.....	80
5.1.10	Razão CD4+/CD8+ de linfócitos do linfonodo mesentérico.....	81
5.1.11	Fagocitose de macrófagos.....	83
5.1.12	Retenção de vermelho neutro em macrófagos.....	84
5.1.13	Produção de ânion superóxido de macrófagos.....	86
5.1.14	Produção de óxido nítrico em animais sem tumor.....	87
5.1.15	Produção de óxido nítrico em animais com tumor.....	88
5.1.16	Fagocitose de neutrófilos.....	90
5.1.17	Retenção de vermelho neutro em neutrófilos.....	91
5.1.18	Produção de ânion superóxido em neutrófilos.....	92
5.1.19	Parâmetros bioquímicos de função renal e hepática.....	93
5.2	EXPERIMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i> , LINHAGENS TUMORAIS.....	95
5.2.1	Proliferação das células B16F10.....	97
5.2.2	Proliferação das células McCoy.....	97
5.2.3	Proliferação das células HeLA.....	98
5.2.4	Proliferação das células HepG2.....	98
5.2.5	Viabilidade das células B16F10.....	100
5.2.6	Viabilidade das células HeLA.....	100
5.2.7	Viabilidade das células McCoy.....	101
5.2.8	Viabilidade das células HepG2.....	101
5.2.9	Avaliação da apoptose/necrose das linhagens celulares.....	103
6	CONCLUSÕES	105
	REFERÊNCIAS	106

1.INTRODUÇÃO



1.1 CÂNCER

O câncer é uma doença genética, marcada pela proliferação local de células anormais, com invasão de estruturas adjacentes e presença de metástases (ESTELLER, *et al.*, 2002; VOGELSTEIN, *et al.*, 1993; ESTEVES, *et al.*, 2001).

As neoplasias podem ser classificadas em malignas e benignas. Os tumores malignos apresentam células com grande potencial de consumo de glicose, com elevado gasto de energia pelo aumento da síntese de proteína e de DNA, elevada capacidade de invadir tecidos e órgãos e de produção de ácido lático. Em contrapartida, os tumores benignos representam massa localizada de células caracterizadas por multiplicação lenta e semelhantes ao tecido normal (OKADA & MAK, 2004; VERMEULEN, *et al.*, 2008).

O processo tumoral é complexo e envolve múltiplos estágios como a iniciação, promoção, progressão e disseminação da doença (CURI, *et al.*, 2002). O comportamento da célula neoplásica é marcado pela proliferação intensa, rápida e descontrolada, presença da estimulação autócrina ou independente de fatores de crescimento para se proliferar pela própria secreção destes fatores, inibição do crescimento pelo contato, diminuição de adesão e perda do controle intracelular do processo proliferativo (CURI, 2000).

Para 2014 no Brasil, foram estimados 302.350 casos novos para o gênero masculino e 274.230 casos novos para o gênero feminino. O câncer de próstata (68.800 casos novos) e o câncer de mama feminina (57.120 casos novos) são os que se mostrarão mais frequentes junto a população masculina e feminina (Figura 1) (BRASIL, 2013)

Localização primária	casos novos	%		Localização primária	casos novos	%
Próstata	68.800	22,8%	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> Homens  </div> <div style="text-align: center;"> Mulheres  </div> </div>	Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%		Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%		Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%		Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%		Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%		Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%		Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%		Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%		Leucemias	4.320	1,6%

* Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

FIGURA 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por gênero, exceto pele e não melanoma. Fonte: INCA (2013)

As propriedades microscópicas das células tumorais envolvem o pleomorfismo em que as células apresentam tamanho e formato variáveis, o hipercromatismo em que a cromatina nuclear cora-se de forma mais acentuada, o polimorfismo onde o núcleo é maior e varia em formato e, por último, arranjos cromossomais anormais, os quais determinam translocações, troca de materiais entre os cromossomos, deleções e adições entre outros (OTTO, 2002).

Sob o ponto de vista cinético, ocorre perda do controle da proliferação celular, perda da capacidade de diferenciação, instabilidade cromossomal, capacidade de metástases e presença de propriedades bioquímicas alteradas em decorrência das modificações do padrão enzimático ou de alterações do DNA (OTTO, 2002).

Nas neoplasias malignas, a elevada taxa de multiplicação celular conduz ao crescimento da massa tumoral, o que faz com que a quantidade de oxigênio que chega por difusão não seja suficiente para atender as necessidades do tumor. Desse modo, o tumor utiliza-se da angiogênese ou formação de novos vasos para garantir maior aporte de oxigênio (WEIDEMANN & JOHNSON, 2008).

Em seguida, são frequentes as metástases, em que as células tumorais irão colonizar outras áreas do corpo. Primeiramente, as células devem se separar do tumor principal, invadir os tecidos vizinhos e a membrana basal, entrar e sobreviver na circulação sanguínea, linfática ou no espaço peritoneal e migrar até o órgão alvo (HUNTER, 2004).

1.1.1 Caquexia oncológica

O termo caquexia é derivado do grego “*Kakus*” (ruim) e “*Hexis*” (condição) (SARHILL, *et al.*, 2003; MARTIGNONI, *et al.*, 2003). Trata-se de síndrome metabólica caracterizada pela presença de anorexia, perda de peso involuntária, comprometimento funcional, depleção de massa muscular e de tecido adiposo (WILSON, 2000; HUHMAN, *et al.*, 2005).

É considerada desnutrição protéico-energética grave e pode acometer até 50% dos pacientes oncológicos (SARHILL, *et al.*, 2003). No Brasil, um estudo de prevalência da desnutrição hospitalar revelou que 66% dos pacientes portadores de câncer encontravam-se desnutridos, indicando que a presença do tumor aumentou o risco de desnutrição em 3,7 vezes (WAITZBERG, *et al.*, 2001).

A presente complicação é frequente em pacientes com tumores malignos e a origem da desnutrição nestes pacientes é multifatorial (YOUNES & NOGUCHI, 2000). Entretanto, a incidência da caquexia não é distribuída igualmente entre todos os tipos de tumores. Pacientes com câncer gástrico ou pancreático apresentam maior frequência de perda de peso (~85%), pacientes com câncer de colon, próstata e pulmão formam grupo intermediário (48-60%), e paciente com câncer de mama, leucemia aguda não-linfocítica e sarcomas tem baixa frequência de perda de peso (30-40%). Isso indica que tumores que induzem a caquexia apresentam diferente expressão gênica dos fatores que induzem a degradação das reservas de triacilgliceróis e de proteínas no músculo esquelético (TISDALE, 2005).

Acredita-se que o hipercatabolismo apresente papel relevante na caquexia, visto que portadores de tumores demonstram gasto energético aumentado aliado a diminuição da ingestão alimentar. O consumo elevado de altas taxas de glicose, pela via anaeróbia em tumores de crescimento rápido é outro padrão fisiológico evidenciado (ARGILÉS, *et al.*, 1997).

Grande parte dos tumores sólidos produzem concentrações elevadas de lactato (INUI, 2002; BLAAUW, *et al.*, 1997; DODESINI, *et al.*, 2007) o qual é convertido em glicose no fígado, efeito esse chamado de ciclo de Cori (Figura 2).

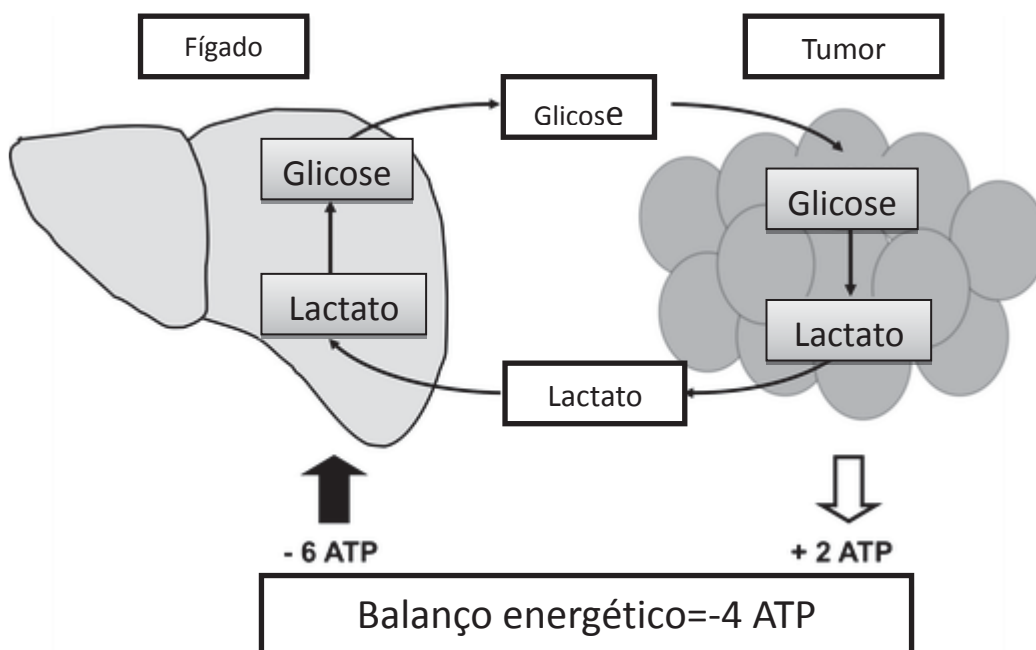


FIGURA2: Esquema representativo do ciclo de Cori. Nota: A glicose é convertida em lactato ao invés de CO_2 devido baixas concentrações de oxigênio que não permitem o ciclo de Krebs. O lactato é transferido para o fígado, onde é utilizado para a síntese de glicose (gliconeogênese). Adaptado Árgiles, *et al.*, 2014.

A gliconeogênese, à custa do lactato, utiliza moléculas de adenosina trifosfato (ATP) a qual é dispendiosa para o hospedeiro visto que gera aumento do gasto energético (INUI, 2002). Aproximadamente 20% do *turnover* de glicose acaba sendo representado pela atividade do ciclo de Cori. Entretanto, na caquexia oncológica o quadro mostra-se mais complexo e revela que esse *turnover* aumenta para 50% (TISDALE, 2000). E à medida que ocorre aumento da massa tumoral, há aumento do *turnover* de glicose (RIVADENEIRA, *et al.*, 1998).

No paciente oncológico, a desnutrição corresponde a um processo multicausal dependente de fatores associados à doença, ao tratamento e ainda, a ingestão alimentar, assim como a condição econômica e social. Acredita-se que a ingestão alimentar, o gasto energético, a absorção e o metabolismo de nutrientes (GARÓFOLO, *et al.*, 2005; ERDEM, *et al.*, 2001) assim como as complicações orais, a toxicidade gastrointestinal e a nefrotoxicidade, causada por fármacos utilizados no

tratamento das neoplasias, são fatores preditivos da desnutrição no câncer (GARÓFOLO, 2005; GARÓFOLO, *et al.*, 2005).

Assim, tal complicação não deve ser atribuída apenas à oferta reduzida de nutrientes (TISDALE, 1999), pois o metabolismo intermediário do paciente encontra-se modificado (BLAAUW, 1997). A síndrome é marcada por distúrbios hidroeletrólíticos, anemia, imunossupressão, alterações bioquímicas, baixa ingestão de nutrientes e má absorção (RIVADENEIRA, *et al.*, 1998). O menor consumo de nutrientes e os distúrbios absorptivos se associam a resposta inflamatória a qual induz a produção hepática de proteínas de fase aguda como a transferrina, albumina, anti tripsina, o que pode incorrer em depleção de aminoácidos (MARTIGNONI, *et al.*, 2003).

Dentre os fatores de risco para a depleção do estado nutricional na caquexia incluem a presença de tumores pulmonares, gastrointestinais, a história pregressa de doenças, idade, presença de desordens digestivas e absorptivas, assim como o uso prolongado de nicotina (HUHMANN & CUNNINGHAM, 2005).

Nesse quadro, múltiplas citocinas produzidas pelos monócitos do hospedeiro atuam na indução tumoral da caquexia e anorexia (ERDEM, *et al.*, 2001; TISDALE, 2005). A própria produção crônica de citocinas pelo hospedeiro e pelo tumor conduz as alterações metabólicas presentes em pacientes oncológicos (RIVADENEIRA, *et al.*, 1998). De fato, o fator alfa de necrose tumoral (TNF α), o interferon gama (INF γ) e as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) são capazes de induzir a caquexia oncológica (INUI, 1999) pela degradação de massa magra e ainda alterações no metabolismo de carboidratos e de lipídeos, o que resulta em consumo de gordura subcutânea e ainda consumo de massa magra (INUI, 2002).

As alterações do metabolismo dos carboidratos incluem *turnover* de glicose e ainda resistência à insulina (DODESINI, *et al.*, 2007), o que promove a hipoglicemia verificada em pacientes sem estresse, submetidos a jejum prolongado (RIVADENEIRA, *et al.*, 1998). Nesta patologia a intolerância à glicose é considerada uma das primeiras alterações metabólicas. Entretanto, a resistência à insulina não se encontra relacionada à desnutrição, e sim a presença do próprio tumor (DODESINI, *et al.*, 2007)

Com relação aos estoques de gordura, depleção significativa desses níveis reflete o estado caquético (INUI, 2002). A própria mobilização de ácidos graxos dos adipócitos pode se antecipar a perda de peso sugerindo a presença do Fator

Mobilizador de Lipídeos (FML). Em contraste, citocinas inibem a enzima lipase lipoproteica, o que resulta em aumento nas concentrações de lipídios (TISDALE, 2000).

A menor sobrevida do paciente oncológico encontra-se associada ao comprometimento significativo da massa magra em indivíduos com câncer avançado (TISDALE, 2000). Em pacientes oncológicos desnutridos, o aumento do turnover de proteínas e a perda de nitrogênio corporal são encontrados de 50% a 70% dos pacientes oncológicos (RIVADENEIRA, *et al.*, 1998). Biópsias da musculatura esquelética de pacientes oncológicos refletem redução na síntese de proteína, e ainda aumento da proteólise. Entretanto, o *turnover* de proteínas corporais é significativamente maior em pacientes com câncer, com perda ponderal explicada pela prioridade no que se refere a síntese hepática de proteínas de fase aguda (INUI, 2002).

O panorama metabólico apontado, resulta em extensa depleção tecidual, anorexia, anemia e dano ao paciente oncológico (GRIMBLE, 2003).

1.1.2 Câncer e apoptose celular

A morte celular programada é fenômeno biológico fundamental para a manutenção do desenvolvimento e a regulação da homeostase tecidual (KELLY, *et al.*, 2011; FAVALORO, *et al.*, 2012). Ocorre em diversas situações fisiológicas como a organogênese, hematopoiese, involução cíclica dos órgãos reprodutivos da mulher, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano por agentes genotóxicos (MEIER, *et al.*, 2000). Representa um obstáculo para o desenvolvimento do câncer (CHAABANE, *et al.*, 2013), uma vez que é responsável pela eliminação de células danificadas. Assim, as células tumorais desenvolveram estratégias para limitar ou evitar a morte celular. Dentro dessas estratégias, a superexpressão de proteínas e inativação de genes pró-apoptóticos, bem como alterações na via de sinalização da p53 são estratégias utilizadas pelo câncer (REBUCCI & MICHIELS, 2013).

A apoptose é regulada por moduladores, incluindo íons (cálcio), genes (c-myc, Bcl-2, Bax, Fas), proteínas (p53, caspases, IAPs) e organelas (mitocôndria, retículo endoplasmático) (ULUKAYA, *et al.*, 2011). Usualmente podem ser ativadas

por duas vias principais, convergindo para a ativação de proteínas efetoras específicas de morte celular denominadas caspases (GRANCI, *et al.*, 2010; FUKUI, *et al.*, 2012). Durante o processo, a célula sofre inúmeras alterações morfológicas como a condensação da cromatina, desorganização do citoesqueleto, vacuolização do citoplasma e a própria externalização dos resíduos de fosfatidilserina na membrana plasmática dos corpos apoptóticos (MARTIN, *et al.*, 1995).

As vias de apoptose são denominadas extrínsecas e intrínsecas (BRUNELLE & LETAI, 2009; GALLUZZI, *et al.*, 2011). A apoptose extrínseca é mediada principalmente por receptores de morte (CD95, FAS e TNF), resultando na ativação intracelular da caspase iniciadora (caspase-8) e executoras (caspase-3 e caspase-6) (GALLUZZI, 2011; ULUKAYA, *et al.*, 2011).

A via extrínseca ocorre por estimulação de sinais extracelulares decorrentes da conexão de ligantes a receptores transmembrana específicos, ativando uma cascata de sinalização de caspases. A via intrínseca ou mitocondrial é ativada em resposta a condições intracelulares decorrente de estresse (FAVALORO, *et al.*, 2012; REUBOLD, *et al.*, 2012).

Na via mitocondrial o potencial de membrana da mitocôndria é alterado e a produção de ATP cessada, levando à liberação de proteínas que contribuirão para a ativação das caspases. A via intrínseca é regulada pela família de proteínas Bcl-2 (*B-cell lymphoma*) caracterizadas pela presença de pelo menos, um domínio homólogo à Bcl-2. Funcionalmente, podem ser classificadas em proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1) e pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bcl-xs, Bok, Bad, Bik, Bid e Bim) (FAVALORO, *et al.*, 2012; REUBOLD, *et al.*, 2012).

A expressão elevada de Bcl-2 já foi evidenciada em linfomas e tumores sólidos como os cânceres de pulmão, rim, ovário e mama. A maior expressão de Bcl-x_L já foi descrita em mielomas e linfomas, em tumores de pulmão e osteosarcomas (KELLY, *et al.*, 2011; FAVALORO, *et al.*, 2012).

1.1.3 Imunologia no câncer

Os mecanismos pelos quais o sistema imunológico promove suas ações no câncer sempre foram investigados. No princípio, acreditava-se que leucócitos infiltrados na massa tumoral poderiam erradicar as células neoplásicas (BALKWILL & MANTOVANI, 2001). Entretanto, a infiltração de leucócitos em carcinoma de mama e de mastócitos em adenocarcinoma de pulmão e melanoma se associa a complicações importantes como a própria amplificação inflamatória. Por outro lado, a infiltração leucocitária, principalmente de células NK em tumores gástricos, de cólon e reto em humanos se associa a um prognóstico positivo (VISSER *et al.*, 2006).

O sistema imunitário é dividido em sistema inato e sistema adaptativo (CALDER, 2007). A imunidade inata ou natural é a primeira linha de defesa e está presente antes da exposição a patógenos. Sua função é impedir a entrada de agentes infecciosos no organismo. Entretanto, a imunidade natural não tem memória imunológica e não sofre influências pela exposição prévia ao agente infeccioso. Seus mecanismos de ação compreendem as barreiras físicas e fatores solúveis entre outros. Os fagócitos são os principais efetores da imunidade inata. Podem ser incluídos dentro desse grupo os granulócitos como neutrófilos, basófilos e eosinófilos, monócitos, macrófagos e células natural killer (NUNES, 2009).

A imunidade natural promove a destruição direta do patógeno pelas proteínas do sistema complemento e pelos produtos tóxicos liberados pelas células via fagocitose. Vários mediadores químicos da resposta imunológica são gerados, favorecendo a resposta inflamatória, promovendo o acúmulo de fagócitos no local da infecção e impedindo a propagação do antígeno (CALDER & KEW, 2002; PEQUITO, 2009).

Dentro desse contexto, os macrófagos apresentam valiosa participação. Os mesmos são provenientes de células tronco progenitoras localizadas na medula óssea, pertencentes à linhagem mielóide (JANEWAY, *et al.*, 2007).

Outras células como os neutrófilos também podem ser recrutadas. Essa população celular representa a segunda maior família de fagócitos. Apresentam meia-vida curta e são abundantes no sangue, entretanto não se encontram presentes em tecidos de indivíduos saudáveis (JANEWAY, *et al.*, 2007; PEQUITO, 2009).

O evento fagocítico é um evento complexo realizado por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (NIEDERGANG & CHAVRIER, 2004). A ligação do antígeno aos receptores celulares promove o evento fagocítico, liberação de proteínas citotóxicas e destruição dos microorganismos patogênicos pelo sistema complemento ou por produtos químicos tóxicos como os radicais superóxido e peróxido de hidrogênio (CALDER, 2007).

O radical hidroxila (OH) é o radical mais reativo nos sistemas biológicos. Apresenta meia vida curta de aproximadamente 10^{-9} s. Assim, seus efeitos acontecem próximo ao local de síntese. O mesmo reage com aminoácidos, DNA e RNA e ainda, promove a lipoperoxidação sobre ácidos graxos poli-insaturados (VALKO, *et al.*, 2007). O radical hidroxila é formado a partir do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^+), denominada reação de Fenton.

O H_2O_2 é altamente deletério, pois participa de reações que produzem o radical hidroxila (OH). Apresenta meia vida longa e a capacidade de atravessar camadas lipídicas e reagir com hemoproteínas e metais de transição (OLSZEWER, 1995). O radical superóxido (O_2^-) é gerado principalmente em mitocôndrias, microssomas e peroxissomas (COMHAIR & ERZURUM, 2002). Apresenta instabilidade com vida média de milissegundos o que dificulta sua passagem pelas membranas (DAMASCENO, *et al.*, 2002). Apesar de ser oxidante fraco (OLSZEWER, 1995), o mesmo pode reduzir o ferro iônico e seus complexos proteicos (COMHAIR & ERZUUM, 2002).

Radicais superóxido são rapidamente reduzidos pelas enzimas superóxido dismutase mitocondrial (Mn-SOD), superóxido dismutase citoplasmática (Cu, Zn-SOD) e superóxido dismutase extracelular (EC-SOD), levando a produção de H_2O_2 (NORDBERG & ARNER, 2001). O óxido nítrico (ON) reage facilmente com outros radicais livres gerando moléculas menos reativas. O mesmo inibe a peroxidação dos lipídios nas membranas celulares (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

O ON é uma substância de elevado interesse biológico. Encontra-se envolvido na neurotransmissão, controle da pressão sanguínea, inflamação e nos mecanismos de defesa contra microorganismos e tumores (COSTA, *et al.*, 2003). Entretanto, o descontrole em sua síntese encontra-se relacionado a doenças cardiovasculares, rejeição a transplantes, doenças degenerativas, sepsis, genotoxicidade e surgimento de neoplasias. O óxido nítrico apresenta ação

antitumoral, porém toda atividade depende das quantidades geradas e da interação das células do hospedeiro com o tumor (COSTA, *et al.*, 2003). Corresponde ainda ao principal mediador citotóxico de células imunológicas efetoras ativadas e constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imunitário (DUSSE, *et al.*, 2003).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) atuam na sinalização celular, apoptose, no controle da pressão sanguínea e na fagocitose de agentes patogênicos (VASCONCELOS, *et al.*, 2007). Quando a produção das EROs ultrapassa a normalidade, o organismo dispõe de um sistema antioxidante. O estresse oxidativo decorre do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante. Dentro dessa condição, ocorre predomínio dos oxidantes levando a lesão celular (VASCONCELOS, *et al.*, 2007). De fato altas concentrações de EROS podem danificar organelas celulares, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (VALKO, *et al.*, 2007).

A lipoperoxidação é outro evento mediado pelas EROs. Envolve o ataque a ácidos graxos insaturados das membranas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; MILLS & HIGGINS, 1997; ANDRADE JUNIOR, *et al.*, 2005). O processo de dano celular envolve ainda quebra e modificações nas bases purínicas e pirimídicas e nos açúcares desoxirribose favorecendo alterações na expressão gênica, mutações e apoptose celular (ANDRADE JUNIOR, *et al.*, 2005). As EROs apresentam ainda as propriedades de alterar ou interferir em algumas vias metabólicas como a própria inflamação, onde atuam como mediadores químicos e ativadores de leucócitos, amplificando a resposta inflamatória (MILLS & HIGGINS, 1997). Existem evidências que o efeito oxidativo apresenta correlação com o envelhecimento e ainda indução ao câncer, doenças auto-imunes, cardiopatias, doenças pulmonares, entre outras condições crônicas (GUERRA, 2001; ZWART, *et al.*, 1999; GUTTERIDGE, 1993).

Os mecanismos pelos quais o sistema imunitário inato regula a carcinogênese podem ser diretos ou indiretos. O mecanismo direto envolve a indução de danos ao DNA pela geração de radicais livres e regulação parácrina de vias intracelulares. Nos mecanismos indiretos são verificados a promoção da angiogênese e remodelação de tecidos pela produção de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e metaloproteases, pela regulação da ciclooxigenase 2 (COX 2) e pela supressão das respostas imunitárias antitumorais (VISSER, *et al.*, 2006).

A imunidade adaptativa é mediada pelos linfócitos T e B. Os linfócitos B apresentam a capacidade de produzirem anticorpos específicos para um determinado antígeno (NUNES, 2009). A imunidade mediada por células é uma das

atribuições dos linfócitos T. Eles reconhecem antígenos protéicos oriundos de microorganismos intracelulares que foram apresentados na superfície das células infectadas (GALLI & CALDER, 2009).

As principais células efetoras da imunidade adquirida são os linfócitos T auxiliares ou *helper* (Th) (CD4⁺) e os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺). Patógenos extracelulares estimulam a população de linfócitos T *Helper*, enquanto que os patógenos intracelulares estimulam linfócitos T citotóxicos os quais promovem a destruição de células infectadas e ainda de células tumorais (THIES, *et al.*, 2001; GALLI & CALDER, 2009).

Uma das subpopulações dos linfócitos T *helper*, os linfócitos Th1 produzem citocinas IL-2 e IFN- γ (THIES, *et al.*, 2001) as quais promovem a ativação de macrófagos, neutrófilos, células natural Killer (NK) e linfócitos T citotóxicos (GALLI & CALDER, 2009). Outra subpopulação dos linfócitos T *helper* são os Th2, responsáveis pela produção da IL-10 (THIES, *et al.*, 2001), IL-4 e IL-5 (NUNES, 2009).

Quanto aos linfócitos citotóxicos, a maioria da resposta mediada por essas células ocorre pelo reconhecimento de antígenos tumorais associados e apresentados por moléculas MHC-1. A menor expressão das moléculas MHC-1 no processo oncológico é reconhecido como mecanismo importante para o tumor escapar da vigilância imunológica (SHARMA, *et al.*, 2007).

O sistema imunitário apresenta papel relevante no desenvolvimento do câncer, pois além de produzir citocinas atua diretamente na imunovigilância. Apenas quando as células tumorais burlam as barreiras do sistema imunitário é que ocorre a progressão tumoral e a morte do hospedeiro (ZITVOGEL, *et al.*, 2008).

1.1.4 Modelos Experimentais Para o Estudo do Câncer

1.1.4.1 Tumor de Walker 256

A indução de câncer em animais, assim como o cultivo de células tumorais são abordagens relevantes na investigação da dinâmica tumoral. O tumor de Walker 256 tem sido utilizado em pesquisas experimentais de câncer por possuir baixa ocorrência de regressão tumoral, ser específico para ratos e ainda apresentar células que são facilmente transplantadas (FISHER & FISHER, 1961).

Segundo FERNANDES (1995), o tumor de Walker 256 é um carcinosarcoma, que se desenvolveu espontaneamente na região da glândula mamária de uma rata grávida e que foi descoberto em 1928 por George Walker no *John's Hopkins University School of Medicine*. Foi localizado na parede abdominal esquerda com tamanho semelhante ao de uma noz. O que se observou foi que durante a lactação o tumor regredia, mas retomava o crescimento após o desmame (EARLE, 1935).

Em 1935 e 1954, esse tumor foi transplantado em ratos Sherman por inoculação subcutânea, sendo palpável em uma semana, levando a morte dos animais após seis semanas. Após 15 dias do transplante subcutâneo, o tumor foi descrito como massa firme, esférica, lobulada e parcialmente encapsulada, promovendo metástases nos linfonodos pulmonares, regionais e ocasionalmente retroperitoniais (DUNN, 1945; LIKELY, *et al.*, 1952; MIDER, *et al.*, 1948; McCOY & NEUMAN, 1956).

Dois subtipos de carcinosarcomas de Walker 256 têm sido utilizados por apresentarem diferenças marcantes na interação com o organismo do hospedeiro. O tipo A, invasivo e metastizante, tem lento ritmo de crescimento induzindo à anorexia e caquexia somente na fase terminal, garantindo sobrevivência média de 27 dias. Ao contrário, o tipo B, não invasivo e de crescimento rápido, induz à anorexia e à caquexia precoce com sobrevida de somente 15 dias. Logo, esse último tornou-se importante modelo para estudos da caquexia induzida pelo câncer (figura 3) (GUAITANI, *et al.*, 1983).

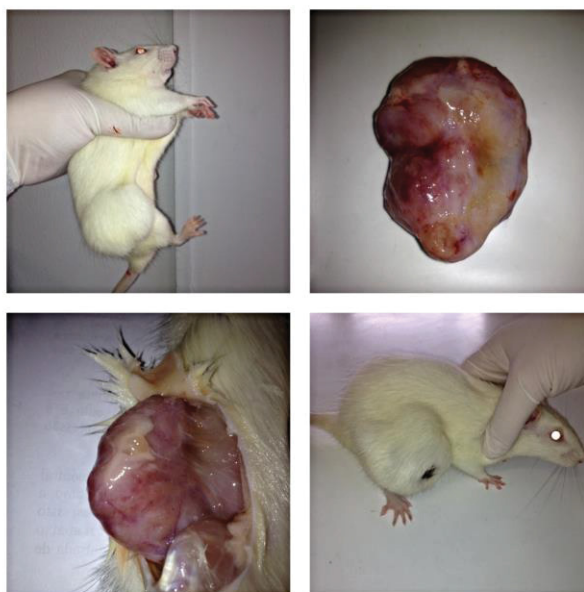


FIGURA 3: Tumor sólido de Walker 256 após 14 dias de inoculação/ Fonte:Laboratório de Metabolismo Celular-UFPR. Fotografia: o autor, 2014.

Estudo histológico de células de tumor de Walker 256 a partir de crescimento intramuscular foi documentado por CHEW em 1975. Morfologicamente, apresentavam formato arredondado ou oval, com núcleo grande e membrana nuclear exibindo margens irregulares e apresentando invaginações. Em seu citoplasma foram encontrados numerosos poliribossomos, sugerindo elevada atividade de síntese protéica. Citofilamentos foram encontrados difusos na área perinuclear, na periferia e como projeções citoplasmáticas. Acredita-se que a presença destas estruturas em células malignas se correlacione com a sua motilidade e invasividade (CHEW, *et al.*, 2004).

Algumas vias de inoculação podem ser utilizadas para a administração das células tumorais de Walker 256, como: subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, intracardíaca, sanguínea arterial, venosa e tecido ósseo. Na inoculação subcutânea (figura 4) ocorre o desenvolvimento de tumores sólidos, firmes à palpação, encapsulados, podendo ocorrer infiltração da pele e da musculatura adjacente. A inoculação destas células através da via intraperitoneal (figura 5) produz o desenvolvimento da forma ascítica do tumor de Walker 256 (GUIMARAES, *et al.*, 2010).

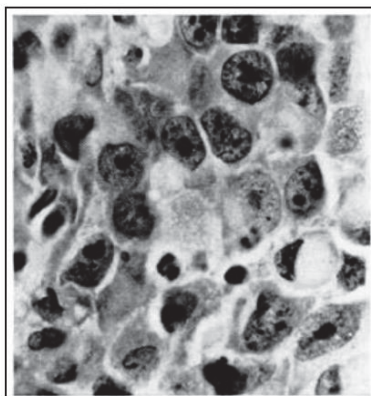


FIGURA 4- Microscopia de luz da forma sólida do tumor de Walker 256 transplantada em ratos. Visualização de células principais e células indiferenciadas coradas em hematoxilina e eosina.x 100. AGOSTINO & CLIFFTON, 1968

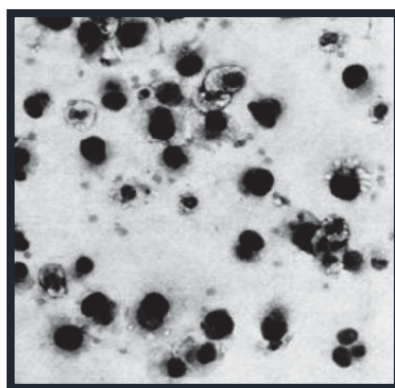


FIGURA 5- Imagem de microscopia de luz do fluído peritoneal obtido de rato portador de tumor ascítico de Walker 256. Visualização de células principais coradas em giemsa x 800. AGOSTINO & CLIFFTON, 1968.

1.1.4.2 Linhagens B16F10 (melanoma murino), HeLA (câncer de colo de útero), McCoy (fibroblastos de camundongo) e HepG2 (Hepatocarcinoma humano)

As culturas celulares derivam de explantes primários ou de suspensão de células dispersas cultivadas em monocamadas aderentes em substrato sólido, ou em suspensão em meio de cultura para células não aderentes (FRESHNEY, 2005).

Os estudos *in vitro* permitem a análise do crescimento, da diferenciação e da morte celular. Admitem ainda manipulações genéticas relevantes para o conhecimento estrutural e funcional dos genes. As vantagens associadas ao

procedimento incluem o controle do pH, da pressão osmótica, da temperatura e da tensão de CO₂ e O₂. A cada replicação celular as amostras são idênticas e as características das linhagens irão se perpetuar. Somando-se a isso, a cultura de células financeiramente é mais econômica que os testes *in vivo*, pois reduz o número de animais em experimentos e evita questões éticas e morais relacionadas a esses ensaios (FRESHNEY, 2005).

Em 1962, a *Cell Biology Collection* organizou-se frente à necessidade de autenticação e preocupação com a ausência de contaminação nas linhagens celulares em várias áreas da biologia e medicina. No final da década de 80, o desenvolvimento de linhagens celulares oriundas de tumores humanos favoreceu os estudos *in vitro* (NCI, 2012).

As células de melanoma murino B16-F10 frequentemente são utilizadas como ferramentas para o estudo do melanoma. Essa linhagem foi estabelecida por Filder (1973) através de melanomas desenvolvidos naturalmente em camundongos C57BL/6. Através de seleção progressiva, Filder obteve o isolamento de variantes com diferentes graus de potencial metastático (ZHAO, *et al.*, 2001).

As descobertas de Filder acerca das características de implantação, invasão, sobrevivência para a formação de metástases permitiu a obtenção da B16F1 que evoluiu até a B16F10 com maior potencial metastático e naturalmente mais agressivo (ZHAO, *et al.*, 2001).

A linhagem HeLA (câncer de colo uterino) foi utilizada por Jonas Salk para testar a primeira vacina contra a poliomielite em 1950. Desde então, as células HeLA são utilizadas em investigações sobre o câncer, a AIDS, os efeitos da radiação e de substâncias tóxicas (SKLOOT, 2010).

A linhagem de células McCoy é originada de fibroblastos de um tumor de camundongo. Essa linhagem forma uma única camada de células na superfície plana de um frasco para cultura celular. Quanto a linhagem HepG2, seu isolamento ocorreu em 1979 em um adolescente argentino. Sua morfologia mostra-se semelhante à morfologia do parênquima hepático. Da mesma forma, tais células são capazes de sintetizar e secretar a maioria das proteínas plasmáticas características das células normais do fígado humano, além de marcadores tumorais (KNOWLES, *et al.*, 1980).

1.2 NUTRIÇÃO E CÂNCER

Nos últimos 200 anos, houve redução considerável no consumo de ácidos graxos poliinsaturados n-3 (AGPI n-3), vitaminas antioxidantes C e vitamina E, aumento no consumo de gordura total, gordura saturada, gordura rica em AGPI n-6 e de ácidos graxos *trans* (SIMOPOULOS, 1999; SIMOPOULOS, 2002). Tais modificações verificadas no padrão dietético foram relacionadas com a maior incidência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (figura 6) (FERGUSON, 2004).

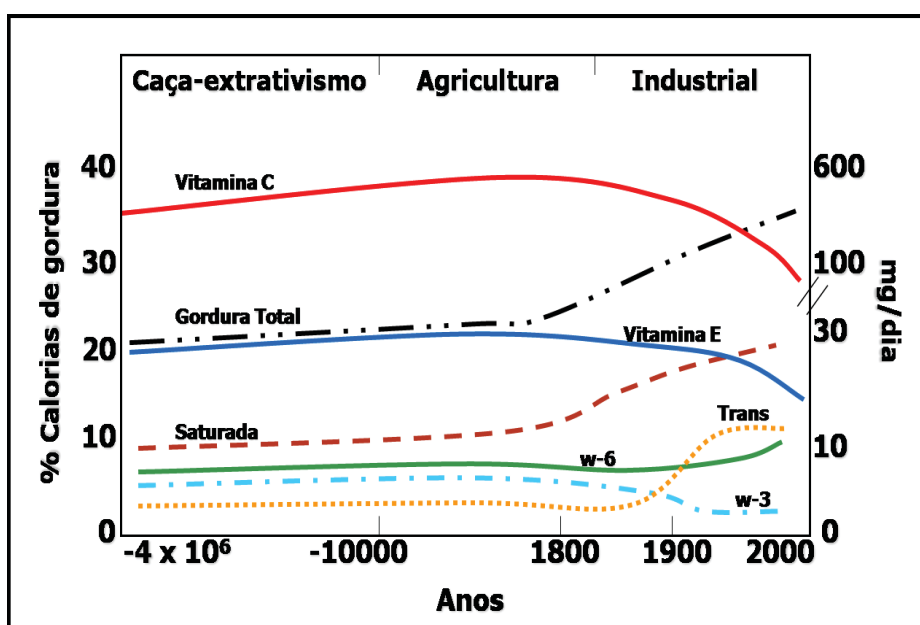


FIGURA 6: Percentual de calorias ingeridas a partir de gorduras, desde o homem paleolítico até o ano 2000. FONTE: SIMOPOULOS (1999).

Assim, a associação entre nutrição e câncer é bidirecional uma vez que nutrientes podem induzir alterações mutagênicas ou, proteger o organismo contra fatores mutagênicos (VALDÉS-RAMOS & BENÍTEZ-ARCINIEGA, 2007),

Os AGPI n-3 são reconhecidamente substâncias capazes de limitar a carcinogênese. Outra substância que tem despertado interesse pela comunidade científica é a capsaicina, devido sua atividade antimutagênica e anticarcinogênica (KUDA, *et. al.*, 2004). Uma vez que os AGPI n-3 e a capsaicina retardam o desenvolvimento tumoral, e que o efeito combinado dos mesmos ainda é desconhecido, investigações devem ser conduzidas nessa direção.

1.2.1 Ácidos graxos poli-insaturados n-3 (AGP N-3)

Os lipídios são definidos como moléculas biológicas solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em água (FAHY, *et al.*, 2005). Apresentam em sua estrutura química os ácidos graxos provenientes tanto da alimentação, quanto da biossíntese endógena (VESCOVI, *et al.*, 2008). Tais ácidos graxos apresentam longas cadeias de átomos de carbono ligados a átomos de hidrogênio (MENENDEZ & LUPU, 2007).

De acordo com a extensão da cadeia, os ácidos graxos classificam-se em AG de cadeia curta com 4 a 8 átomos de carbono; cadeia média de 8 a 12 carbonos e os de cadeia longa com mais de 12 átomos de carbono. A presença ou não de duplas ligações na cadeia determina o grau de saturação do ácido graxo. Os AG saturados não apresentam duplas ligações entre os átomos de carbono, enquanto que os insaturados apresentam uma ou mais duplas ligações na cadeia carbônica. Os Monoinsaturados (MUFAs) apresentam apenas uma dupla ligação e os poli-insaturados (PUFAs) apresentam duas ou mais duplas ligações. Propriedades como solubilidade e flexibilidade são determinadas pelo tamanho dessa cadeia carbônica e ainda seu grau de insaturação. Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa são mais flexíveis e solúveis que os ácidos graxos saturados (NETTLETON, 1995). Os ácidos graxos insaturados são divididos em ômega-7, ômega-9, ômega-6 e ômega-3. O ômega 7 e o ômega 9 são monoinsaturados e podem ser sintetizados pelo organismo humano, enquanto que o ômega-6 e o ômega-3 são poliinsaturados e devem ser obtidos pela alimentação (CURI, *et al.*, 2002; SIMOPOULOS, 2008).

A metabolização dos ácidos graxos poliinsaturados ocorre no fígado. Entretanto, esse processo também pode ocorrer em outros tecidos (PATTERSON, *et al.*, 2011).

Os ácidos graxos poliinsaturados apresentam duas ou mais duplas ligações em sua cadeia carbônica. Os AGPI n-6 apresentam a primeira dupla ligação presente no sexto carbono a partir do carbono ômega. O mesmo é consumido na dieta principalmente como ácido graxo linoléico (AL) (18:2 n-6), presentes em óleos vegetais como o milho, soja e girassol (HARDMAN, 2014).

O ácido linoléico da família $\omega 6$ também pode ser encontrado no óleo de cártamo e algodão. Já o α -linolênico, representante da família $\omega 3$, é encontrado em sementes oleaginosas como canola, soja e linhaça. Além do α -linolênico, seus derivados como os ácidos eicosapentaenóico (EPA-C20:5, $\omega -3$) e

docosahexaenóico (DHAC22:6, ω -3) apresentam elevado interesse nutricional. AGPI n-3 de cadeia maior, principalmente o ácido graxo eicosapentaenóico (EPA) (20:5 ω -3) e ácido graxo docosahexaenóico (DHA) (22:6 ω -3), são encontrados em peixes marinhos de águas geladas como a cavala, salmão, sardinha, arenque, dourado; e seus óleos que apresentam em média 60% de EPA e DHA (YAQOOB, 2004; HARDMAN, 2004; McCUSKER & GRANT-KELS, 2010).

A inabilidade dos mamíferos em produzirem ácidos graxos poliinsaturados se deve a falta da enzima Δ 12 dessaturase e Δ 15 dessaturase (CURI, *et al.*, 2002). Os ácidos graxos poliinsaturados ω -3 e ω -6 podem ser alongados e dessaturados para formar outros ácidos graxos da mesma série. O ácido linoléico (AL) é metabolizado em ácido araquidônico (AA) (20:4 ω -6) e o ALA em ácidos eicosapentaenóico (EPA) (20:5 ω -3) e docosahexaenóico (DHA) (22:6 ω -3) pela atuação das enzimas Δ 6 e Δ 5-dessaturases e por alongases (figura 7) (SIMOPOULOS, 2008; HULL, 2011, CALDER, 2012).

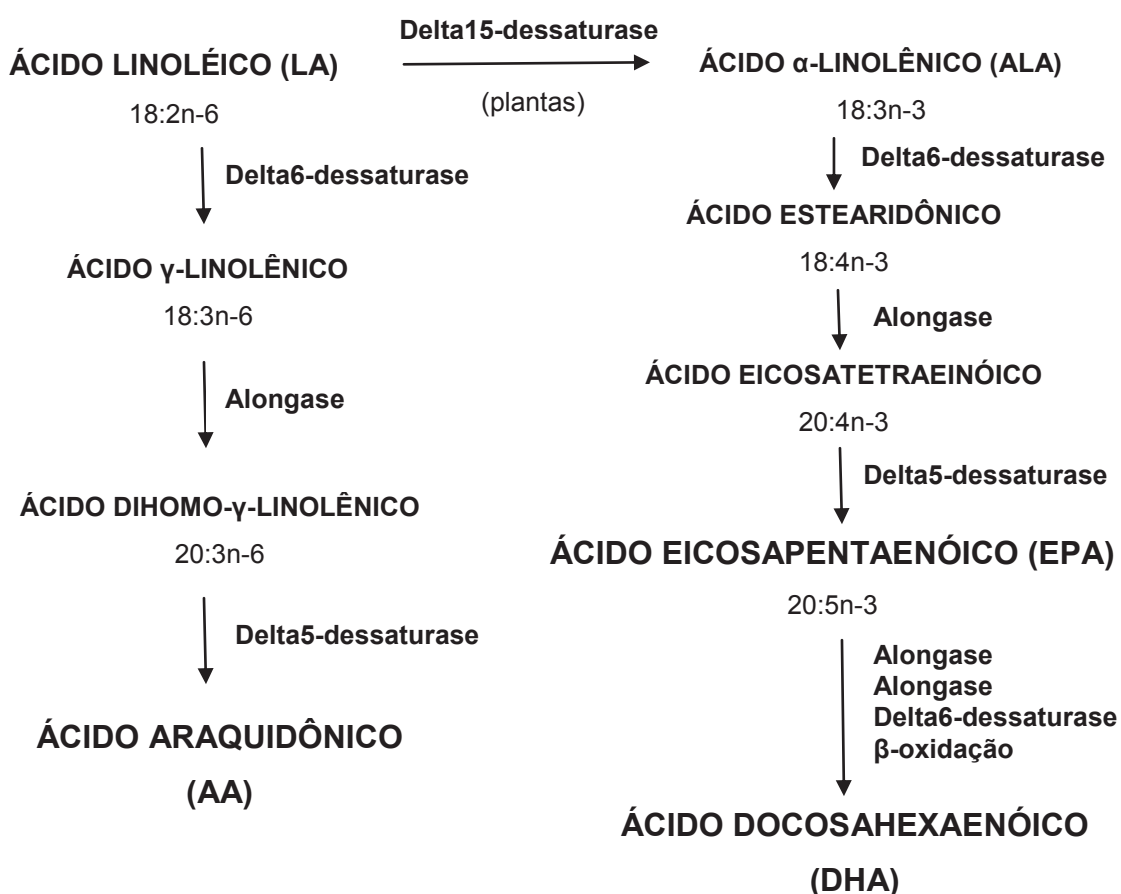


FIGURA7: metabolização dos agpi n-6 e n-3 (adaptado de CALDER, 2012)

A essencialidade dos ácidos graxos poliinsaturados n-6 é conhecida desde 1930. Em contrapartida, somente a partir de 1980 descobriu-se a necessidade dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 na dieta, especialmente na prevenção de distúrbios neurológicos e visuais e sua correlação na prevenção de determinados tipos de câncer (CURI, *et al.*, 2002). Em adição, os AGPI apresentam pouca ou nenhuma toxicidade (FUKUI, *et al.*, 2013); o que se mostra favorável considerando-se que a maioria das drogas utilizadas no tratamento do câncer aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*) se correlacionam a elevada toxicidade (GRANCI, *et al.*, 2010).

1.2.2 Ácidos graxos poliinsaturados n-3 e câncer

Os lipídeos provenientes da dieta apresentam diferentes composições de ácidos graxos derivados de gorduras animais e certos óleos vegetais como soja, girassol e milho os quais elevam os riscos de câncer. Em contrapartida, os ácidos graxos presentes no azeite de oliva, na linhaça e de óleos de peixes marinhos, se associam com a redução dos riscos de câncer (SAUER, *et al.*, 2007).

Estudos *in vivo* e *in vitro* indicam que os AGP n-3 estão envolvidos na redução da inflamação, e ainda na prevenção de determinadas condições crônicas como as doenças cardiovasculares, artrite reumatóide, síndrome metabólica e obesidade (MOLENDI-COSTI, *et al.*, 2011; CALDER, 2012). Os AGPI n-3 também apresentam importância tanto na prevenção quanto no desenvolvimento do câncer (CORSETTO, *et al.*, 2011; WILLIAMS, *et al.*, 2011).

Os benefícios associados a sua suplementação são reconhecidos pela comunidade científica, entretanto os mecanismos pelos quais os AGPI n-3 promovem seus efeitos biológicos ainda não são completamente entendidos (CALDER, 2012).

Dentro das principais funções dos AGPI n-3 e ainda n-6, a sua conversão enzimática em eicosanóides apresenta importância importante (HARDMAN, 2004). O ácido araquidônico (ácido eicosatetraenóico n-6) é o principal responsável pela formação dos eicosanóides das séries 2 e 4: prostaglandinas, leucotrienos,

tromboxanas e lipoxinas (VOLEK, *et al.*, 2008). Os eicosanóides são substâncias biologicamente ativas com meia vida curta e que atuam localmente desencadeando mudanças nas células ou tecidos onde são produzidos (GIL, 2002; LAPILLONNE, *et al.*, 2003). Tratam-se de ácidos graxos oxigenados compostos por 20 carbonos. São formados por 3 vias principais, tendo como seu maior precursor o ácido araquidônico. Tais vias são compostas pelas enzimas ciclo-oxigenase, lipoxigenase e epoxigenase, estando as duas primeiras relacionadas à formação de metabólitos inflamatórios (SUCHNER, *et al.*, 1994).

Os eicosanóides modulam a resposta inflamatória e a resposta imunológica, apresentam papel importante na agregação plaquetária, no crescimento e na diferenciação celular (HARDMAN, 2004).

As prostaglandinas; encontradas em pequenas concentrações em praticamente todos os tecidos de mamíferos (MANTOVANI, *et al.*, 2008), foram isoladas em sêmen de humanos e de animais. Elas podem ser sintetizadas a partir do ácido γ -linolênico, araquidônico e EPA (TAPIERO, *et al.*, 2002). As prostaglandinas da série dois, produzidas a partir do AA (ácido Araquidônico) tendem a ter ação pró-inflamatória e proliferativa na grande maioria dos tecidos, enquanto que as prostaglandinas da série três, produzidas a partir do ácido eicosapentaenóico (EPA), apresenta efeito inflamatório e proliferativo menor, sendo assim menos favoráveis ao desenvolvimento de células cancerosas (HARDMAN, 2004).

Estudos demonstram que a prostaglandina E2 (PGE2) estimula o crescimento de células tumorais de colon através de receptores acoplados à proteína-G EP2 (GPCR-EP2), pela ativação do fosfoinositol-3-quinase (PI3K) e proteína quinase B ou Akt (PKB/Akt). Assim, a prostaglandina E2 é capaz de promover a sobrevivência das células tumorais (CASTELLONE, *et al.*, 2005).

Tromboxanas são produzidas pelas plaquetas, atuam na coagulação sanguínea (WANG & DUBOIS, 2008), e as lipoxinas, apresentam função antiinflamatória (MCMAHON & GODSON, 2004).

O ácido eicosapentaenóico (EPA) e o docosahexaenóico (DHA) atuam como agentes anticancerígenos (MAZZOTTA & JENEY, 2008; RIEDIGER, *et al.*, 2009) e ainda, induzem a menor depleção corpórea, maior taxa de lipoperoxidação tumoral, menor proliferação das células tumorais, menor expressão de Cox-2 e maior taxa de apoptose por maior incorporação de EPA (SHIETZEL, 2012).

Tanto o EPA, quanto o DHA, ricamente presentes no óleo de peixe, apresentaram propriedades anti-proliferativas em células do tumor de Walker 256, *in vivo* (TOGNI, *et al.*, 2003; PINTO JR, *et al.*, 2004; PIZATO, *et al.*, 2005; MUND, *et al.*, 2007, SCHIESSEL, 2011) e *in vitro* (OLIVEIRA, 2006; LLOR, *et al.*, 2003; ANDERSON, *et al.*, 2009; YANG, *et al.*, 2012).

O EPA em culturas de linfomas foi capaz de ativar a via intrínseca. O DHA foi capaz de modificar a expressão de proteínas da família Bcl-2 em células de linhagem de câncer de cólon; as proteínas pró-apoptóticas Bak e Bcl-xS estavam aumentadas, enquanto as anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-x_L estavam reduzidas (SERINI, *et al.*, 2009).

Assim, a própria supressão da biossíntese dos eicosanoides derivados do ácido araquidônico (ARA), o que resulta em alteração da resposta imunológica frente à presença de células tumorais e respectiva modulação da inflamação corresponde a um mecanismo importante anti câncer (SIDDIQUI, *et al.*, 2007).

Outros mecanismos envolvem o impacto negativo sobre a proliferação celular, apoptose, disseminação das metástases e processo angiogênico. Os AGPI n-3 também influenciam o nível de atividade do Fator de Transcrição Nuclear *kappa* B (NF-*k*B), a expressão gênica e as vias de transdução de sinais, promovendo mudanças no metabolismo, crescimento e diferenciação celular. Os ácidos graxos poli-insaturados n-3 promovem efeitos ainda sobre o metabolismo do estrogênio, o que delimita menor estímulo na formação de células hormônio-dependentes (SIDDIQUI, *et al.*, 2007). A elevação na expressão de fatores de crescimento, assim como a mutação/ superexpressão de proteínas de transdução de sinal dão suporte para a proliferação celular descontrolada (REBUCCI & MICHIELS, 2013).

1.2.3 Capsaicina

Estudos conduzidos nos últimos anos tem demonstrado que a pimenta é capaz de reduzir doenças crônicas pelo seu efeito desintoxicante no organismo (LUNN, 2007). Em sua composição são encontradas quantidades significativas de vitaminas A, E e C, ácido fólico, zinco e potássio, bioflavonóides, pigmentos vegetais carotenóides como o licopeno, piperina e capsaicina (ANJO, 2004).

Atualmente, existem mais de cento e cinquenta variedades de *Capsicum* identificadas, todas estas derivadas de cinco espécies (NETO, 2004). A classificação desse grupo se dá pela análise do grau de pungência, coloração, tamanho e formato dos frutos, além do porte da planta (REIFSCHNEIDER, 2000).

Os estudos conduzidos nos últimos anos com as espécies do gênero *Capsicum* tem conferido as mesmas atividade antihiperlipidêmicas (KUDA, *et al.*, 2004), anti inflamatórias (SURH, *et al.*, 2002), anti oxidantes (GANJI, 2004) e efeito quimiopreventivo no câncer (SURH, *et al.*, 2002). Dentro desse contexto a capsaicina tem se mostrado substância promissora. Pesquisa nos últimos dez anos tem atribuído a mesma propriedades medicinais relacionadas à cicatrização de feridas, efeito antioxidante, prevenção da trombose pela dissolução de coágulos sanguíneos e redução dos riscos de aterosclerose (ADAMS, 2007). Suas ações se estendem ainda sobre a produção de endorfinas cerebrais (GENDRON, *et al.*, 2006) e tratamento de dor associada com artrite e neuropatia diabética (NUEZ, 1995).

A Capsaicina ou 8-metil-N-vanilil 1-6 nonamida (figura 8) é substância hidrofóbica, incolor e inodora com ação irritante (BONTEMPO, 2007) encontrada na pimenta, cuja manipulação requer atenção especial visto que sua inalação não é tóxica, porém é perturbadora das vias aéreas e da pele (CARREIRO, 2006).

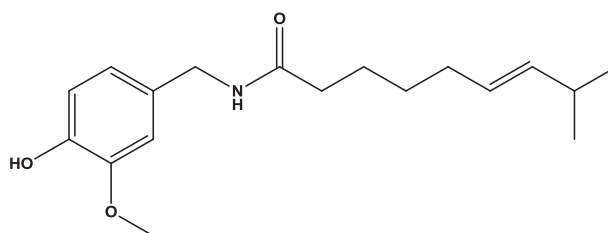


FIGURA 8- Estrutura química da capsaicina (*trans*-8-metil-N-vanilil-6-nonenamida)

Trata-se do componente picante de maior destaque das frutas de plantas do Gênero *Capsicum* pertencente à Família Solanaceae e nativa das Américas (PERRY, *et al.*, 2007). Seu isolamento ocorreu em 1816 em uma forma cristalina parcialmente purificada (PEREIRA, 1854), entretanto somente em 1876 a forma purificada foi obtida (THRESH, 1876). Tresch, foi efetivamente o primeiro a isolar esta substância, denominando a capsacina como uma substância irritante extraída da pimenta vermelha do gênero *Capsicum* (GASPARETTI, 2000).

A capsaicina interage com 30 nociceptivos ou receptores vanilóides. Dentre eles, o mais estudado é o TRPV1 o qual é encontrado na membrana plasmática e em neurônios sensíveis ao calor (LUO, *et al.*, 2011). Dependendo de sua concentração, a capsaicina também apresenta ação mucolítica, termogênica, analgésica e antiinflamatória (PERUCKA, *et al.*, 2007).

A Capsaicina induz a apoptose, e ainda pode inibir a proliferação em ampla variedade de células tumorais, sugerindo assim significativa atividade anti-cancer (BODE & DONG, 2011). Tais propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas são explicadas em função da inibição de enzimas relacionadas à mutação de células, ou pela inibição de metabólicos carcinogênicos como, por exemplo, o NNK [4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone] presente no tabaco (MODLY, 1986). Entretanto, o efeito quimiopreventivo atribuído a capsaicina é questionado visto que em alguns modelos experimentais percebeu-se risco associado ao consumo da capsaicina e o aparecimento de células tumorais (NAGABHUSHAN & BHIDEM, 1985). Em estudo experimental com células de câncer de próstata (LNCaP), foi verificado aumento na viabilidade e proliferação dessas células, pela maior expressão de receptores andrógenos via PI3K e MAPK em cobaias tratadas com capsaicina (MALAGARIE-CAZENAVE, *et al.*, 2009). Em outros estudos *in vivo*, tanto a pimenta quanto a própria capsaicina isolada demonstraram efeito carcinogênico (SERRA, *et al.*, 2002; LÓPEZ-CARRILLO, *et al.*, 1994; HOCH-LIGETI, 1951; TOTH & GANNETT, 1992).

Após seu consumo, a capsaicina liga-se a receptores Vanilóides relacionados a dor na boca e garganta, os quais encontram-se associados também a sensação de calor (PEREIRA, 1854). O padrão de distribuição da capsaicina indica acúmulo característico no intestino e no fígado, sugerindo assim distribuição mais centralizada sobre esses órgãos e ainda potencial uso contra células tumorais envolvidas nesses tecidos (tabela 1) (SURESH & SRINIVASAN, 2010).

Tabela 1. Distribuição tecidual de capsaicina administrada em ratos por v.o. (Adaptado de Suresh & Srinivasan, 2010)

T	Soro($\mu\text{g/mL}$)	Sangue*	Fígado*	Ríns*	Intestino*
1	1,90 \pm 0,18	11,11 \pm	24,7 \pm 2,1	3,61 \pm	1057,0 \pm
3	1,47 \pm 0,09	8,59 \pm 0,53	44,7 \pm 3,37	5,71 \pm	700,2 \pm 42,2
6	0,83 \pm 0,10	4,85 \pm 0,59	14,8 \pm 1,50	6,73 \pm	249,3 \pm 24,0
24	0,05 \pm 0,01	0,29 \pm 0,06	8,71 \pm 2,55	3,35 \pm	43,5 \pm 3,75
48	0,006 \pm	0,035 \pm	0,60 \pm 0,03	0,48 \pm	1,14 \pm 0,21
96	0,00	0,00	0,045 \pm	0,00	0,72 \pm 0,01
192	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Nota: Valores médios \pm EPM de 6 ratos. Capsaicina foi administrada v.o. para ratos na dose de 30 mg/Kg de peso corporal. O tempo (T) está em horas. * $\mu\text{g/sangue}$ total.

Entretanto, sua reduzida biodisponibilidade em outros tecidos corporais poderia prejudicar sua ação sobre diferentes linhagens tumorais. Da mesma forma, a alta taxa de metabolização da capsaicina por enzimas hepáticas (CYP2E1, 1A2, 1A1, 3A4, 2B6, 2C8, 2C9, e 2C19) representa problema farmacocinético importante e limitador das ações biológicas do produto (REILLY & YOST, 2006).

1.2.4 Capsaicina, câncer e receptores vanilóides (TRPV-1)

OS receptores vanilóides TRPV1 (*Transient receptor potential vanilloid type-1*) ou VR1, clonado por Caterina e colaboradores em 1997, SÃO canais catiônicos permeáveis a Na^+ e especialmente ao Ca^{2+} que pertencem a família das proteínas denominadas TRP (*transient receptor potencial*) (STAROWICZ, *et al.*, 2007). Os TRP são divididos em três subfamílias: TRPC (*canonical*), TRPV (vanilóide), TRPM (melastatin). O TRPV1 ou VR1 (figura 9) foi o primeiro a ser clonado entre um grupo de seis canais iônicos TRP ativados por temperatura, sendo quatro deles ativados por calor (TRPV1-4) e dois ativados pelo frio (TRPM8 e TRPA1) (CATERINA & JULIUS, 2001). A subfamília TRPV pode ser ativada por toxinas produzidas por algumas plantas como a capsaicina e resineferatoxina (RTX); toxina produzida pela *Euphoria resinifera* (CATERINA, *et al.*, 1997).

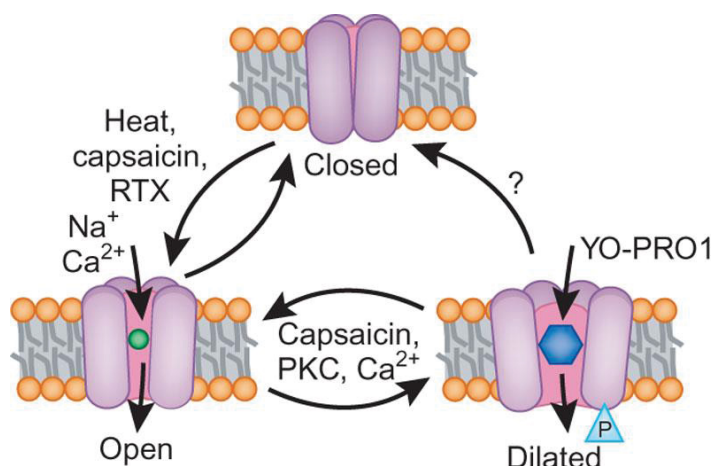


FIGURA 9- Canal TRPV1 ou VR1. Fonte: Bautista e Julius, 2008

Nos últimos anos, várias substâncias têm sido identificadas como ativadores de receptores TRPV1, como compostos inflamatórios tais como a bradicinina, produtos das lipoxigenases (12-HPETE e leucotrieno B₄, 5 (s)-HPETE (ácido hydroperoxyeicosatetranoico) e / ou leucotrieno B₄) e ainda lipídios (VAN DER STELT & DI MARZO, 2004).

Mesmo sendo canal não seletivo, este receptor do tipo 1 da família TRP e subfamília vanilóide está sujeito a diferenciados níveis de controle por interações com outras moléculas. Dentro desses diferentes níveis de controle identifica-se a fosforilação reversível catalisada por cinases intrínsecas como por exemplo a proteína cinase A e C e fosfatases como a calcineurina. Outro nível de regulação é pela compartimentalização. No retículo endoplasmático o TRPV-1 está presente em diferentes formas reguladas, uma dependente de inositol- trifosfato- IP₃ – e outra não. O TRPV-1 pode ainda ter sua atividade regulada pela expressão gênica, embora este processo ainda não esteja totalmente elucidado (CORTRIGHT, *et al.*, 2004).

Dentre os fatores que diminuem a expressão do VR1 incluem o tratamento com agentes vanilóides e de privação de fatores de crescimento, especialmente no tecido nervoso. Em contrapartida, sua maior expressão intensifica-se em condições inflamatórias (CORTRIGHT, *et al.*, 2004). Interessantemente, o canal do TRPV1 é o único membro da subfamília vanilóide ativado pela capsaicina. O nocaute da TRPV1, em humanos e camundongos, apresenta insensibilidade a capsaicina. As curvas de ativação para a corrente capsaicina nos canais naturais e no receptor clonado

indicaram coeficiente de dois pela equação de Hill, sugerindo a existência de mais de um sítio de ligação da capsaicina (WHITE, *et al.*, 2010).

Os canais iônicos TRPV1 desempenham papel importante na regulação de Ca^{+2} , identificando os mesmos como reguladores importantes da atividade intracelular. Atualmente, esses receptores são reconhecidos por influenciar na migração e morte de algumas células (WHITE, *et al.*, 2010).

O TRPV1 medeia a morte de alguns tipos celulares por mecanismos diferenciados. A ativação do TRPV1 resulta no influxo de Cálcio, o que pode representar efeito citotóxico para a célula. Iadorola e colaboradores (2001) observaram que três organelas vitais como o retículo endoplasmático, as mitocôndrias e o núcleo das células são imediatamente danificados pelo aumento da concentração intracelular de Cálcio, resultante da ativação de agonistas do TRPV1 (WHITE, *et al.*, 2010). Em seu estudo, Iadorola e colaboradores (2001) observaram que embora os sinais primários de toxicidade sejam semelhantes aos eventos relacionados a apoptose como bolhas nucleares e coloração do núcleo por iodeto de propídio, a fragmentação da cromatina, a formação de corpos apoptóticos e a ativação de caspases não eram aparentes dentro de 24 horas (OLAH, *et al.*, 2001).

Outra sugestão é que os vaniloides possam mediar a morte das células por ação direta na mitocôndria, e que a capsaicina, a resiniferatoxina, a capsazepina e SB366791 (antagonista do TRPV1) são todos inibidores mitocondriais, habéis em ativar a apoptose e a necrose por mecanismos que não envolvem o receptor TRPV1 (ATHANASIOU, *et al.*, 2007). Dependendo da sua exposição à capsaicina, células como timócitos de ratos que expressam o TRPV1 dependente ou não dependente do ligante podem manifestar morte (AMANTINI, *et al.*, 2007).

Estudos de imunohistoquímica (TOTH, *et al.*, 2005) e RT-PCR (MEZEY, *et al.*, 2000) indicam ampla distribuição do TRPV1 em áreas como o hipocampo, córtex, cerebelo, bulbo olfatório, mesencéfalo e rombencéfalo, em neurônios, em pericitos e em astrócitos. Da mesma forma, queratinócitos, células β pancreáticas, células endoteliais, linfócitos, macrófagos e as células de diferentes regiões do cérebro expressam o TRPV1. Também pode ser encontrado no urotélio de bexiga humana (WHITE, *et al.*, 2010).

Células tumorais também expressam os receptores TPV1. Em astrócitos humanos normais, assim como em células tumorais de origem astrocítica, tais receptores podem ser encontrados (AMANTINI, *et al.*, 2007). Interessantemente, na

transição de células do urotélio da bexiga para células tumorais, a expressão desse canal iônico diminui progressivamente à medida que o câncer evolui para estágios mais agressivos, sugerindo que a expressão desse receptor esteja correlacionada com o estágio de diferenciação da célula (WHITE, *et al.*, 2010).

O aumento da expressão do receptor TRPV1 é encontrado em carcinoma de células escamosas de língua humana. Da mesma forma, o aumento da expressão de receptores CB1 e TRPV1 é verificado em carcinoma de próstata humana (CZIFRA, *et al.*, 2009). A capsaicina inibe o crescimento de células de câncer de próstata independentes de andrógeno e com p53 mutado (WHITE, *et al.*, 2010).

De fato, os ligantes do TRPV1 podem apresentar efeitos anti-proliferativos e/ou pró-apoptóticos (MORI, *et al.*, 2006). Independente do efeito mediado pelo TRPV1, resiniferatoxina, capsazepina e capsaicina sugerem inibição mitocondrial que ativam a apoptose e/ ou necrose por mecanismos mediados por não receptores (ATHANASIOU, *et al.*, 2007)

2. JUSTIFICATIVA

A caquexia oncológica é uma síndrome associada à perda significativa de peso, anorexia, fadiga, sarcopenia, anemia e edema. Concomitantemente, a síndrome é acompanhada por modificações no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, o que agrava ainda mais as condições de saúde do paciente oncológico. Desta forma, preservar as reservas fisiológicas e coibir a depleção significa melhorar o prognóstico e a qualidade de vida do paciente com câncer. Dentro desse contexto o suporte dietético com AGPI n-3 têm demonstrado efeito anti-tumoral e anti-caquético. Entretanto, investigações de sua associação com outras substâncias de interesse biológico para o delineamento de terapias anti-câncer ainda são insuficientes. Nos últimos dez anos a capsaicina tem se mostrado como uma dessas substâncias promissoras, cuja atividade antitumoral ainda não está totalmente explicada, sendo assim necessários estudos de seus efeitos isolados e combinados com os AGPI n-3.

3. OBJETIVOS

Avaliar o efeito isolado e combinado da suplementação com óleo de peixe e capsaicina sobre a massa tumoral, caquexia e resposta imunológica de ratos da linhagem Wistar portadores do tumor de Walker 256.

Avaliar o efeito isolado e combinado da suplementação com óleo de peixe e capsaicina sobre a viabilidade, proliferação e morte das linhagens B16F10 (melanoma murinho), HeLA (câncer de colo de útero), McCoy (fibroblastos de camundongo) e HepG2 (Hepatocarcinoma humano)

Para alcançar esses objetivos, os seguintes parâmetros foram analisados:

- ⇒ Determinação da massa dos tumores (g)
- ⇒ Apoptose/ necrose por citometria de fluxo
- ⇒ Avaliação da proliferação de células tumorais pela incorporação da (2- ^{14}C)-timidina em DNA
- ⇒ Avaliação de parâmetros bioquímicos de caquexia: Glicemia, triacilglicerolemia, lactatemia, e concentração de glicogênio hepático.
- ⇒ Avaliação da atividade de fagocitose, volume lisossomal, produção de ânion superóxido, produção de óxido nítrico, em macrófagos e neutrófilos.
- ⇒ Avaliação da proliferação linfocitária
- ⇒ Determinação da população de linfócitos CD4+ e CD8+, obtidos do linfonodo mesentérico
- ⇒ Avaliação da toxicidade renal e hepática dos animais tratados
- ⇒ Caracterização *in vitro* dos efeitos dos tratamentos sobre a viabilidade das Linhagens B16F10 (melanoma murino), HeLA (câncer de colo de útero), McCoy (fibroblastos de camundongo) e HepG2 (Hepatocarcinoma humano)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Os reagentes usados na preparação das soluções foram obtidos da Reagen (Quimibrás Industria Química Ltda®, RJ). Meio de cultura (RPMI 1640) e soro fetal bovino foram adquiridos da Cultilab® (Campinas, SP, BRA), antibióticos (penicilina G e estreptomicina) e tripsina foram adquiridas da Gibco (Grand Island, NY, USA). Zimosan, vermelho neutro e vermelho fenol, nitroblue tetrazolium (NBT), albumina sérica bovina (BSA) foram obtidos da Sigma Chemical Co (St Louis, MO-EUA). Kits comerciais para dosagem de creatinina, uréia, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase foram obtidas da Bioliquid (Laborclin Produtos para laboratório Ltda, Pinhais, Pr, BRA). A anexina V-FITC e 7-AAD utilizados na citometria de fluxo foram obtidos da BD Pharmigen, Biosciences (New Jersey, USA). A timidina foi obtida da New England Nuclear Research Products (Du Pont Company-Biotechnology Systems-EUA). As cápsulas de óleo de peixe foram gentilmente cedidas pela Fundação Herbarium®. A capsaicina foi adquirida da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).

4.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS COM MODELOS *IN VIVO*

4.2.1 Animais

Para os experimentos com tumor de Walker 256 e células do sistema imunológico, foram utilizados 300 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com 70 dias de vida, obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Todos os animais receberam água e ração à vontade e foram submetidos a ciclo claro/escuro de 12/12 horas e mantidos em ambiente com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do setor de Ciências Biológicas (SCB) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), número 712. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular do

Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

4.2.2 Delineamento experimental

Os animais adultos foram separados em 10 grupos (5 animais por grupo), de acordo com o tipo de suplementação, e de acordo com a presença ou não de tumor Walker 256, conforme descrito abaixo:

⇒Grupo sem tumor

C-controle

AE-Álcool Etilico (veículo da capsacina)

CAP-Capsaicina

OP- Óleo de peixe

CAP+OP- Capsaicina mais Óleo de Peixe

⇒Grupo com tumor

W-controle

WAE-Álcool Etilico (veículo da capsacina)

WCAP-Capsaicina

WOP- Óleo de peixe

WCAP+OP- Capsaicina mais Óleo de Peixe

Os animais foram suplementados durante 30 dias com óleo de peixe fornecido gentilmente pela fundação Herbarium®. O óleo de peixe Herbarium é elaborado a partir de extrato de ácidos graxos poliinsaturados marinhos, contém 0,2g de Ômega 3 EPA (ácido eicosapentaenóico) e 0,1g de Ômega 3 DHA (ácido docosahexaenóico). A suplementação foi administrada diariamente via oral com auxílio de micropipeta (1g/Kg de peso corpóreo) durante 30 dias. A partir dos 100 dias de vida, os animais dos grupos nominados com tumor (W) sofreram inoculação no flanco subcutâneo de 1mL de suspensão de células do tumor de Walker 256, contendo 3×10^7 células. Após a inoculação dos grupos W, todos os demais grupos continuaram a receber a suplementação descrita acima por mais 15 dias. Os grupos

tratados receberam nestes 15 dias a Capsaicina na via de administração intraperitoneal, na concentração de 5mg/kg de peso corpóreo. No décimo quinto dia após a inoculação do tumor os animais foram ortotaniados, e os tumores removidos e pesados, em balança previamente aferida (Denver Instrument XL-410), antes de serem destinados para outras experimentações. O sangue foi coletado para determinações bioquímicas, o fígado para dosagem do glicogênio hepático e o linfonodo mesentérico para o isolamento de linfócitos. A sequência da suplementação e obtenção dos tecidos dos 10 grupos de animais foi repetida 6 vezes.

4.2.3 Massa corpórea

A monitorização do peso ocorreu a cada dois dias em balança digital URANO UDI 10000/1.

4.2.4 Obtenção e transplante das células do tumor de Walker 256

Suspensão de 2×10^7 de células do tumor de Walker 256 (1mL) foram injetadas intraperitonealmente em rato macho da linhagem Wistar. Após período de aproximadamente 05 a 07 dias, quando constatada ascite, o animal foi ortotaniado por deslocamento cervical. Volume de 10 mL de solução salina 0,9% foi injetado na mesma cavidade abdominal. Após massagem leve de aproximadamente 30 segundos no abdômem do animal e, por meio de laparotomia mediana foi retirada da cavidade abdominal o lavado peritonal contendo as células tumorais, com o auxílio de pipeta de plástico. As células tumorais obtidas foram contadas em câmara de Neubauer, após serem coradas com azul de tripan, 2g/L em solução salina 0,9% (NaCl 154Mm). A manutenção das células de Walker 256 foi realizada por passagens semanais.

4.2.5 Isolamento dos linfócitos dos linfonodos mesentéricos

Os linfonodos foram mantidos em PBS na presença de antibióticos (penicilina 10.000U e estreptomicina 10mg/mL) (PBS +AB). Os mesmos foram macerados com auxílio de êmbolo de seringa e peneira de malha fina, em placa de petri. Para cada grupo de animais foi obtido um *pool* de linfócitos. O macerado foi então filtrado em papel filtro apropriado e centrifugado a 290g, durante 7 minutos, a 4° C. Os precipitados foram lavados com PBS + AB por 2 vezes. O ultimo sedimento foi ressuspensionado em meio de cultura RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino e antibióticos.

4.2.6 Proliferação Linfocitária

Isolados os linfócitos, solução com 180 µL contendo 2×10^5 células por poço, foram cultivados em meio de cultura RPMI-1640 com Hepes enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos, em placas de 96 poços (volume final de 200 µL) a 37 °C em atmosfera de 95% O₂ / 5% CO₂. Por 48 horas. Metade dos poços de cada grupo de linfócitos foram estimulados com 20 µL/poço de solução hidroalcoólica do mitógeno Concanavalina A (ConA – 5 µg/mL), e outra metade sem estímulo sendo mantidos em cultura por 48 horas. Após este período, foram adicionados 20 µL de solução contendo (2-¹⁴C) -timidina (0,02 µL/poço) (50 mCi/mmol) e as células foram mantidas em cultura por um período adicional de 18 horas, sob as mesmas condições descritas acima. Após, foram coletadas automaticamente em coletor múltiplo (Skatron Combi Multiple Cell Harvester, UK) em papéis filtro nº 11731 FILTERMATS (COX Scientific Ltd. UK). Neste processo não há necessidade de processos extrativos preparatórios para obtenção de DNA celular. Os discos de papéis contendo a radioatividade incorporada ao DNA foram transferidos para tubos contendo 1 mL de líquido de cintilação e levados para mensuração da radioatividade incorporada em DNA em cintilador modelo Beckman LS 6500. Os resultados foram expressos em contagens por minuto (CPM).

4.2.7 Marcadores de superfície

A identificação dos marcadores de superfície para linfócitos T helper ($CD4^+$) e T citotóxico ($CD8^+$) foi realizada por Citometria de Fluxo, segundo metodologia descrita por JEFFERY *et al.*; (1996). Para isto, linfócitos coletados do linfonodo mesentéricos (2×10^5 células/tubo) foram incubados com anticorpo monoclonal contra $CD4^+$ (marcado com o fluorocromo Ficoeritrina (PerCPe) com absorvância de 488 nm e emissão maior que 640 nm – canal FL2) e $CD8^+$ (marcado com o fluorocromo Isotiocianato de fluoresceína (FITC) com absorvância de 488 nm e emissão maior que 530 nm – canal FL1) por 30 minutos. Depois foi feita a lavagem dos anticorpos com tampão PBS filtrado (0,05%). A fluorescência celular foi avaliada por citometria de fluxo (FACS – *fluorescence activated cell sorter*) em equipamento FACSCalibur Becton Dickinson –Biosciences. Os resultados foram expressos em porcentagem positiva de população dos diferentes linfócitos. O software utilizado para a aquisição dos dados foi o Cell Quest™, e para a análise de dados, o programa Weasel v2.6.1®.

4.2.8 Apoptose de células tumorais

Após o isolamento das células tumorais, as mesmas foram lavadas em PBS gelado e resuspensas no tampão de ligação (10mM Hepes pH 7,4, 150mM NaCl, 5mM KCl, 1mM $MgCl_2$ e 1,8mM $CaCl_2$) $1 \times (1 \times 10^6$ células/mL). Cem microlitros de suspensão celular foram transferidos para tubos apropriados, nos quais foram adicionados 1 μ L de Anexina V-FITC (diluída 1:500, vol:vol, conforme instrução do fabricante) e 5 μ L de 7-AAD. Em seguida, a solução foi homogeneizada e incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e no escuro. Quatrocentos microlitros de tampão de ligação foram adicionados, e as células imediatamente analisadas em citômetro de fluxo FACS Calibur Becton Dickinson, equipado com laser argônico (488nm). A molécula de anexina V liga-se especificamente na fosfatidilserina, fosfolípido presente na monocamada interna da membrana plasmática celular, que é translocado para a monocamada externa da membrana plasmática de células sofrendo apoptose. Para cada análise, 10.000 eventos foram adquiridos, e gráficos baseados na emissão de fluorescência do FITC (FL1-H) e do 7 AAD (FL3-H) foram construídos em escala logarítmica. Foram consideradas células positivas aquelas

que expressaram fluorescência acima da linha limite de fluorescência, a qual foi negativa para o controle. Os resultados foram analisados com auxílio do programa WinMDI 2.8 e os dados foram expressos em porcentagem de eventos.

4.2.9 Parâmetros imunitários de macrófagos e neutrófilos

4.2.9.1 Obtenção de macrófagos

Para a obtenção de células peritoneais, os ratos sem e portadores do tumor de Walker 256 foram exsanguinados por decapitação. Após a remoção da pele da região abdominal 10 mL de tampão fosfato-salina (PBS), pH 7,4 foi injetado na cavidade peritoneal dos animais. Após 30 segundos da aplicação, a cavidade peritoneal foi aberta e o fluido, contendo as células, aspirados com o auxílio de pipeta estéril. Em seguida, estas células foram centrifugadas (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) a 150 g. 4 °C, durante 5 minutos. Os macrófagos então, após descarte do sobrenadante, foram ressuspensos em PBS, e em seguida, procedeu-se à contagem destes em câmara de Neubauer corando-se com azul de tripan. Para os ensaios abaixo foram plaqueados por poço 2×10^6 células/mL.

4.2.9.2 Obtenção de neutrófilos

O isolamento dos neutrófilos foi baseado no método proposto por Bøyum, (1976). O sangue coletado dos animais foi transferido para tubos Falcon® de 50 mL e diluídos (1:2) com PBS. A seguir, foi adicionado 3 mL de Ficoll-Paque Plus e em seguida 8 mL do sangue diluído. Logo após, foram centrifugados (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) durante 40 minutos a 400g. Após a separação das células, a camada superior constituída por células mononucleares e plaquetas foi descartada. A camada inferior composta pelos neutrófilos e eritrócitos foi incubada com solução hemolítica em banho-maria por 15 minutos. Depois, centrifugada a 150 G (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em PBS para posterior contagem em câmara de

Neubauer corando-se com azul de tripan 0,2%. Para os ensaios abaixo foram plaqueados por poço 10^6 células/ mL.

4.2.9.3 Fagocitose

Utilizou-se o método descrito por Pipe, *et al.*, (1995) modificado por Bonatto, *et al.*, (2004). Foram depositados 100 μ L da solução de macrófagos ou neutrófilos obtidos como descrito acima, em placa de ELISA e adicionado 10 μ L de zymosan corado com vermelho neutro (solução estoque vermelho neutro: Vermelho Neutro – 0,02g; Dimetilsulfóxido (DMSO) – 1 mL) (solução de fagocitose: partículas de zimosan – 0,02 g; Solução estoque de vermelho neutro – 0,3 mL e PBS – 3 mL) e incubou-se por 30 minutos. Após este procedimento, foi adicionado 100 μ L de fixador de Baker (Cloreto de sódio (NaCl) – 2 g; acetato de cálcio – 1g; formaldeído – 4mL e água milli-Q – 93 mL) para interromper o processo de fagocitose, 30 minutos depois a placa foi lavada com PBS e, posteriormente, centrifugada (Eppendorf – Centrifuge 5810 R), por 5 minutos a 240 g, a fim de remover o zimosan e o vermelho neutro não fagocitado pela células. O vermelho neutro no interior dos macrófagos foi solubilizado utilizando-se 100 μ L de Solução de Extração (ácido acético glacial 96% - 1 mL; etanol – 50 mL e água milli-Q – 49 mL). Em seguida incubou-se por 30 minutos a 37°C e, procedeu-se a leitura das placas, a 550 nm utilizando-se espectrofotômetro (Microplate reader Bio-rad – Benchmark). Os dados foram expressos em % do grupo controle e também normalizados pela adesão.

4.2.9.4 Retenção de vermelho neutro

Para esta análise, em placas do tipo ELISA depositou-se 100 μ L da solução de macrófagos ou neutrófilo e adicionou-se 20 μ L de vermelho neutro a 2% (solução estoque de vermelho neutro – 0,02ml e PBS – 5mL). Após 30 minutos, a placa foi centrifugada (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) por 5 minutos a 240 g. O sobrenadante foi descartado e os poços lavados com PBS, para eliminar o vermelho neutro que não foi internalizado pelas células. Adicionou-se 100 μ L de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro que estava dentro dos lisossomos. Esta solubilização é possível porque o vermelho neutro é corante catiônico que se difunde através da membrana celular e, uma vez presente no lisossomo, fica aprisionado

devido a mudanças de cargas causada pelo pH ácido do sistema lisossomal. Finalmente, após incubação por 30 minutos a 37°C, a placa foi lida a 550 nm utilizando-se espectrofotômetro (Microplate reader Bio-rad – Benchmark). Os dados foram expressos em % do grupo controle e também normalizados pela adesão.

4.2.9.5 Mensuração da produção de Ânion Superóxido (O_2^-)

A geração de ânion superóxido foi estimada pela redução de “nitroblue tetrazolium” (NBT), um composto amarelo lipossolúvel que se torna insolúvel e de cor azul no seu estado reduzido (MADHAVI e DAS, 1994). Depositou-se 100 µL da solução de macrófagos ou neutrófilo em placa de 96 poços e adicionou-se 100 µL de solução de NBT 0,25% (NBT – 0,25 g, Zimosan – 0,5 g e PBS – 100 mL), foram incubados por 30 minutos a 37 °C. Após centrifugou-se (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) por 5 minutos a 240 g e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 100 µL de PBS e centrifugou-se por 5 minutos a 240 g, descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 100 µL de Metanol 50% e incubou-se por 10 minutos a 37°C. Centrifugou-se (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) por 5 minutos a 240g e foi descartado o sobrenadante. Secou-se a quente e solubilizou-se com 120 µL de KOH 2M e 140 µL de DMSO. A placa foi lida a 550 nm utilizando-se espectrofotômetro (Microplate reader Bio-rad – Benchmark). Os dados foram expressos em % do grupo controle e também normalizados pela adesão.

4.2.9.6 Adesão de macrófagos

Foi plaqueado, em microplacas de 96 poços 100 µL de células na concentração de 2×10^5 . Incubou-se por 1 hora em estufa a 37 °C e submeteu-se a procedimentos de lavagem. Metanol 50% foi adicionado para fixação das células e incubado por 5 minutos. Giemsa 0,2% foi adicionado e a microplaca incubada por 40 minutos. Metanol foi adicionado para solubilizar o corante. Após 30 minutos de incubação, a leitura foi realizada a 550 nm (dados não mostrados) utilizando espectrofotômetro (Microplate reader Bio-rad– Benchmark).

4.2.9.7 Produção de óxido nítrico por macrófagos

Para mensuração da produção de óxido nítrico foi utilizada o método descrito por STUEHER & MARLETTA (1985). Por esse método quantificou-se o NO mensurando-se as concentrações de nitrato e nitrito. O reagente utilizado foi o de Griess que, ao reagir com o nitrito produz cor lilás, com leitura a 550 nm. Para esta mensuração, os macrófagos foram coletados assepticamente, centrifugados e ressuspensos em meio RPMI-1640, ajustando-se para a concentração adequada de 2×10^5 células/well para placas de 96 wells. Após plaquear, deixou-se aderindo por duas horas a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂. Após a aderência, lavou-se cada poço 2 vezes com PBS e adicionou-se meio RPMI com soro fetal bovino (10%) e incubou-se por 24 h, nas condições citadas acima. Após a incubação, centrifugou-se a placa a 1500rpm por 5 minutos e do sobrenadante recolheu-se 100µL misturando se a 100µL de Griess. Este reagente foi preparado pouco antes da mensuração na proporção de 1:1. A mensuração da produção de óxido nítrico foi feita preparando-se uma curva de NaNO₃. Estas soluções foram misturadas a 100µL de reagente de Griess. Em seguida, as amostras foram lidas em leitor de microplacas (Bench Mark- Biorad) a 550nm.

4.2.10 Determinação dos parâmetros bioquímicos de caquexia

4.2.10.1 Lactatemia

Foi determinado pelo método enzimático, segundo ENGEL & JONES, 1978. Inicialmente fez-se a desproteinização do soro, pela adição de 50 µL de ácido tricloroacético (TCA a 25%) a 0,5 mL da amostra e a mistura agitada em vórtex, centrifugada por 1 minuto a 17.000 g. Em seguida, foi coletado 200 µL do sobrenadante e adicionado 2 µL de indicador universal para permitir a visualização da neutralização do soro, pela adição de KOH/TRIS (0,5 M / 2 M), sinalizada pela coloração verde, indicando pH 7,0. Em seguida, foi pipetado 100 µL do soro neutralizado em tubos de ensaio contendo 1 mL do tampão de ensaio (descrito abaixo) e, após 45 minutos, fez leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 340 nm. O princípio dessa mensuração consiste na conversão do lactato a piruvato pela ação da lactato desidrogenase (LDh), ocorrendo consumo de NAD⁺

com formação estequiométrica de NADH, o qual pode ser monitorado espectrofotometricamente, fornecendo as concentrações de lactato existente na amostra, segundo a reação:



A partir da medida da absorbância, foi calculada a concentração do lactato sérico em $\mu\text{mol/mL}$, pela fórmula:

$$[\text{Lactato}] = \frac{\text{Abs}}{6,22} + \frac{V1}{V} + \frac{V2}{V3} + \frac{V4}{V5}$$

Sendo:

[Lactato] = concentração de lactato produzida

Abs = absorbância

6,22 = constante

V = volume da amostra

V1 = volume da amostra + tampão de ensaio

V2 = volume do soro com proteínas + TCA

V3 = volume do soro com proteínas

V4 = volume do soro desproteinizado + volume de neutralização

V5 = volume do soro desproteinizado

4.2.10.2 Conteúdo de glicogênio hepático

Este foi determinado segundo o método descrito por LEIGHTON & COOPER (1989) adaptado. Cerca de 90mg de tecido foi pesado e adicionado a tubo de ensaio contendo 500 μL de KOH 1M, e levado a banho-maria a 60°C aproximadamente por 30 minutos para digestão do tecido. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em vórtex e 100 μL do tecido dissolvido foram adicionados em tubo de ensaio contendo 500 μL de tampão acetato pH 4,8 (ácido acético glacial 0,48%, acetato de sódio 12mM, amiloglucosidase 0,1%, água ultrapura q.s.p.), e 17,5 μL de ácido acético glacial. Após agitação em vórtex, as amostras foram mantidas em estufa a 37°C por 2 horas, e em seguida centrifugadas a 15000 rpm, durante 5 minutos. Do sobrenadante foram pipetados 100 μL em outro tubo contendo 1 mL de

tampão trietanolamina (TEA) pH 7,5 (TEA 37mM, MgSO₄ 0,6mM, sal dissódico de ATP 0,96mM, sal sódico de NADP 0,07mM, hexoquinase/glicose-6-fosfato desidrogenase, água ultrapura q.s.p.). Após agitação em vórtex, as amostras repousaram 40 minutos em temperatura ambiente, e em seguida a leitura em espectrofotômetro a 340 nm foi efetuada.

4.2.10.3 Glicemia

A concentração plasmática de glicose foi determinada pelo método enzimático colorimétrico glicose oxidase, utilizando kit de glicose da Bioliquid, seguindo as especificações do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 505 nm e os resultados foram expressos em mg/dL.

4.2.10.4 Triacilglicerolemia-TAG

A concentração plasmática de TAG foi determinada por método enzimático colorimétrico, utilizando os kits triglicérides GPO-Bioliquid conforme especificações do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm e os resultados foram expressos em mg/dL.

4.2.11 Parâmetros bioquímicos de função renal

4.2.11.1 Creatinina plasmática

A determinação da concentração de creatinina plasmática foi determinada pelo método colorimétrico de Jaffé, utilizando kit da Bioliquid, de acordo com as especificações do fabricante. Os resultados foram expressos em mg/dL e a leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas Tecan Infinite 200 a 510 nm.

4.2.11.2 Uréia

A determinação da concentração plasmática de uréia ocorreu através do método enzimático colorimétrico, utilizando kit da Bioliquid, de acordo com as

especificações do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas Teca Infinite 200 a 600 nm e os resultados expressos em mg/dL.

4.2.12 Parâmetros bioquímicos de função hepática

4.2.12.1 Aspartato aminotransferase (AST)

Pelo método cinético UV, utilizando kit da Bioliquid, foi determinada a concentração plasmática de AST, segundo as especificações do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas Tecan Infinite 200 a 340 nm e os resultados expressos em U/L (unidade por litro).

4.2.12.2 Alanina aminotransferase (ALT)

A concentração plasmática de ALT foi mensurada pelo método cinético UV, utilizando kit da Bioliquid, de acordo com as especificações do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas Tecan Infinite 200 a 340 nm e os resultados expressos em U/L (unidade por litro).

4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS COM MODELOS *IN VITRO*

4.3.1 Manutenção das linhagens tumorais

As células B16F10 (melanoma murino) foram cedidas gentilmente pela professora Doutora Célia Regina Cavichiolo, do departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná. As linhagens HeLa (câncer de colo de útero) e McCoy (fibroblastos de camundongo) foram cedidas pela professora Doutora Almeriane Maria Weffort Santos, do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Paraná. A linhagem HepG2 (hepatocarcinoma humana) foi cedida pela professora Doutora Gláucia Regina Martinez do departamento de bioquímica e biologia molecular da UFPR. As células foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂, em meio de cultura RPMI (acrescido de Hepes-3,27 g/L; NaHCO₃ -2 g/L; piruvato de sódio- 0,0125g/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,1% de antibiótico, pH 7,4. As células HepG2 foram cultivadas em garrafas com meio DMEM

alta glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e gentamicina (50 µg/mL). O meio de cultura foi renovado a cada 48-72 h e as células subcultivadas pelo tratamento com solução de tripsina/ EDTA 0,05%; pH 7,4 e transferência para novos frascos com meio de cultura. Todos os reagentes foram pré-aquecidos em banho Maria a 37°C.

4.3.2 Complexação do óleo de peixe a albumina

O óleo de peixe foi solubilizado em solução de albumina sérica bovina (BSA) 2% em meio RPMI 1640, para a complexação a solução foi mantida sob agitação constante em câmara fria por 24 horas. Após este período, as gotículas de óleo não complexadas foram retiradas com auxílio de pipeta de plástico e a solução filtrada em câmara de fluxo laminar usando-se filtro de seringa 0,22 µm. O complexo foi armazenado a -20°C graus até o momento do uso. Para os experimentos, o complexo foi preparado em meio RPMI na proporção de 1:8.

4.3.3 Ensaio com linhagens tumorais

As linhagens em crescimento exponencial, atingindo 80% de confluência foram incubadas com o óleo de peixe complexado a albumina e os demais tratamentos. As células foram plaqueadas em placas estéreis de 24 ou 96 poços e foram expostas aos tratamentos por 24 horas. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

4.3.4 Proliferação celular pela incorporação de timidina radiomarcada

Foram semeados 10^5 células por poço em placas de 96 poços com fundo chato e tampa. Após 2 horas, após a aderência das células nas placas, foram adicionados os tratamentos e 20 µL de solução (2-¹⁴C)- timidina (0,02 µCi/ poço), alcançando-se volume final de 200µL por poço. As células foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ por 24 horas. Após este período, o meio de cultura foi retirado e as células lavadas e desprendidas da superfície com solução de tripsina/ EDTA 0,05%. Em seguida foi adicionado meio de cultura com 10% de soro fetal bovino para inativação da tripsina. Posteriormente as células foram coletadas

automaticamente em coletor múltiplo (Skatron Combi Multiple Cell Harvester, Uk) em papéis filtro apropriados. Os passos seguintes são os mesmos descritos na proliferação linfocitária.

4.3.5 Viabilidade celular por MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT -3 (-4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio brometo. As desidrogenases mitocondriais das células viáveis, clivam o anel de tetrazólio levando a formação de cristais de formazan que são insolúveis em meio aquoso. Assim sendo, foram semeadas 10^4 células por poço em placa de 96 poços (TPP), seguindo os tratamentos propostos. Após 24 horas de incubação foi adicionado por 20 μ L/poço de solução de MTT (ACRÓS Organics) em PBS, na concentração de 0,5mg/mL. A placa foi incubada a 37°C e 5% de CO₂ por 3 horas. Em seguida o meio foi removido sendo adicionado 150 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido) para dissolução dos cristais de formazan. A placa foi mantida em agitação no escuro por 15 minutos e em seguida foi realizada a leitura da microplaca em leitor Tecan Infinite 200, em filtro de 570 nm. Os resultados foram realizados em triplicata expressos em porcentagem de células viáveis.

4.3.6 Marcação necrose/ apoptose

Após o tratamento de 24 horas em atmosfera úmida a 37° C, com 5% de CO₂, as células foram lavadas com PBS gelado e ressuspensas no tampão de ligação 1x (1×10^6 células/mL). Os passos seguintes são os mesmos descritos para a apoptose de células tumorais de Walker 256.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se o programa GraphPad Prism®. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média submetidos à análise de variância de duas vias tendo tumor e suplementação como variáveis. Nível significância para $p < 0,05$ foi empregado para indicar diferença estatística.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTAÇÃO “IN VIVO”

O estudo do padrão dietético de nossos ancestrais tem revelado o consumo de vegetais, grãos e animais marinhos ricos em AGPI n-3 (SIMOPOULOS, 2002). Entretanto, a revolução industrial ocorrida nos últimos 200 anos, ampliou o consumo de gorduras e fontes de AGPI n-6. Em adição, houve acentuada redução no consumo de AGPI n-3 na dieta, fato esse que tem sido associado ao surgimento de diversas doenças (ROSE & CONNOLLY, 1991; CAYGILL, *et al.*, 1996). Dentro desse contexto, o câncer merece atenção especial, uma vez que a alimentação exerce papel marcante no desenvolvimento dessa condição.

Em nosso modelo experimental (Walker 256), a massa tumoral (g) (figura 10) obtida dos animais portadores de tumor e alimentados com dieta padrão foi de $18,47 \pm 0,41$ (g), enquanto que o grupo óleo de peixe (WOP) chegou a $8,48 \pm 0,31$ (g). Assim, a suplementação com óleo de peixe (WOP) no modelo estudado foi capaz de promover redução de 54% no tamanho dos tumores em comparação ao grupo controle (W) $p < 0,05$. A mesma redução da massa tumoral (g) no modelo estudado, já foi evidenciada em outros estudos experimentais (PIZATO, *et al.*, 2005; MUND, *et al.*, 2007; IAGHER, *et al.*, 2010). Nesses, a redução gerada pelo óleo de peixe (WOP) foi de aproximadamente 50% em relação ao grupo controle (AIKAWA, *et al.*, 2008; FOLADOR, *et al.*, 2006; PINTO, *et al.*, 2004).

De acordo com a literatura científica, após o período mínimo de duas semanas, em animais expostos a dietas enriquecidas com AGPI n-3, o DHA é incorporado aos fosfolípidos de membrana de muitos tecidos. Entretanto, a retirada da suplementação resulta em rápida liberação de AGPI n-3 da membrana plasmática, comprometendo assim a continuidade dos efeitos biológicos mediados por esses ácidos graxos (TURK & CHAPKIN, 2013).

Em adição, além de promover a redução da massa tumoral (g), os AGPI n-3 diminuem a possibilidade de metástases, modulam a resposta imunitária e atenuam os mecanismos relacionados à caquexia oncológica (SIMOPOULOS, 2010). O ácido

eicosapentaenóico (EPA) e o docosahexaenóico (DHA) promovem ainda menor depleção corpórea, maior taxa de lipoperoxidação tumoral, menor proliferação das células tumorais, menor expressão da Cox-2 e maior taxa de apoptose por maior incorporação de EPA (SHIETZEL, 2011).

Para tanto, os AGPI n-3, principalmente os ácidos eicosapentaenóicos (EPA) e docosaexaenóicos (DHA) apresentam mecanismos anticarcinogênicos importantes (STOLL, 2002; SIMOPOULOS, 2003; MAZZOTTA, *et al.*, 2008; RIEDIGER, *et al.*, 2009; SIMOPOULOS, 2010). Entretanto os mecanismos pelos quais os AGPI n-3 promovem seus efeitos biológicos ainda não são completamente entendidos (CALDER, 2012). Tais mecanismos parecem ser mediados por múltiplas vias de sinalização que conectam membrana celular, citosol e núcleo (CALDER, 2012). Alguns trabalhos experimentais sugerem, entre esses mecanismos, a habilidade dos AGPI n-3 em diminuir a capacidade proliferativa das células tumorais (KOBAYASHI, *et al.*, 2006; HERING, *et al.*, 2007), elevar a taxa de peroxidação lipídica nestas células (HARDMAN, *et al.*, 2002; MUND, *et al.*, 2007), diminuir a produção de eicosanóides no interior do tumor (TAPIERO, *et al.*, 2002; McENTEE & WHELAN, 2002) e alterar na sinalização intracelular de células tumorais (LIM, *et al.*, 2008).

Nesse sentido, os achados científicos já mencionados conduziram os profissionais da área de saúde a recomendarem o consumo de AGPI n-3 (RIEDIGER, *et al.*, 2009). Entretanto, a investigação dos efeitos biológicos do óleo de peixe combinado com outras substâncias de interesse biológico ainda é insuficiente para o delineamento de condutas combinadas para o paciente oncológico, considerando-se a gravidade da condição patológica, a síndrome caquética e a diminuição da expectativa de vida do paciente.

Dentro desse contexto, os animais portadores do tumor (W) também foram expostos ao tratamento com a capsaicina (WCAP) isolada e ainda administrada concomitantemente à suplementação com o óleo de peixe (WCAP+WOP). Pesquisas nos últimos dez anos tem demonstrado que a capsaicina apresenta propriedades medicinais definidas, atuando como cicatrizante de feridas, antioxidante, agindo na dissolução de coágulos sanguíneos, prevenindo aterosclerose, controlando o colesterol e evitando hemorragias (ADAMS, 2007). Seus efeitos ainda sugerem propriedades antitumorais, uma vez que a capsaicina induz o ciclo celular de detenção ou apoptose (BODE & DONG, 2011), evento esse fundamental no controle da disseminação de células tumorais.

Interessantemente, no modelo estudado, tanto o grupo capsaicina (WCAP), quanto capsaicina combinada com o óleo de peixe (WCAP+WOP), promoveram efeitos semelhantes ao grupo suplementado com óleo de peixe (WOP) quando comparados ao grupo controle (W), reduzindo em aproximadamente 49% e 45% o crescimento tumoral ($p < 0,05$). Os dados sugerem que a capsaicina (WCAP) isolada ou combinada com o óleo de peixe reduz a massa tumoral (g). Entretanto, novos estudos devem ser conduzidos, pois as vias bioquímicas pelas quais a capsaicina exerce tais efeitos ainda não estão totalmente elucidadas. Historicamente, a capsaicina tem sido associada a estudos clínicos para dor neuropática e formulações tópicas (Capzasin-HP e Qutenza/NGX-4010) (BACKONJA, 2010) e injetáveis (Adlea/ALGRX-4975) (SZOLCSANYI, *et al.*, 2012) no tratamento da dor, rinite alérgica e enxaqueca (RAPOPORT, 2012), e em suplementos alimentares para a perda de peso (INOUE, *et al.*, 2007). Assim, o conhecimento da utilização da mesma como agente antitumoral é recente, o que demanda mais investigações pela comunidade científica.

5.1.1 Massa Tumoral

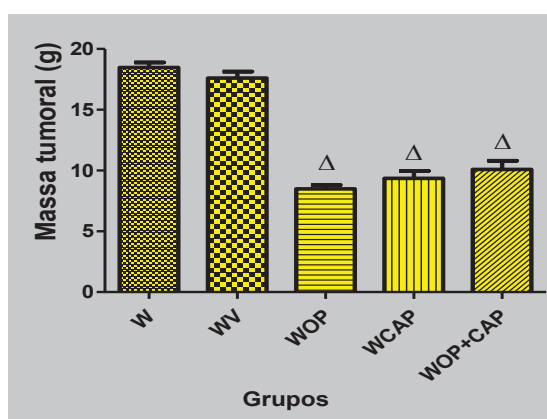


FIGURA 10: Massa tumoral (g) obtida de ratos portadores do tumor de Walker 256 alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (WOP), tratados com capsaicina (WCAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+ WCAP). Os dados estão apresentados como média \pm EPM, de 15 animais por grupo. Δ $p < 0,05$ vs. W

W	WV	WOP	WCAP	WOP+WCAP
18,47±0,41	17,60±0,54	8,48±0,31	9,35±0,62	10,09±0,71

O estudo dos parâmetros de caquexia também fez parte da investigação dos possíveis efeitos mediados pelos tratamentos. Para tanto, foram avaliadas a concentração plasmática de lactato, a concentração de glicogênio hepático, a glicemia e a triacilglicerolemia.

O modelo experimental do tumor de Walker 256 permite o estabelecimento do estado caquético pelo acompanhamento dos parâmetros bioquímicos mencionados, bem como a determinação da massa corpórea dos animais (TOGNI, *et al.*, 2003). O estudo da caquexia oncológica apresenta relevância significativa uma vez que essa condição se associa ao comprometimento da massa muscular e do tecido adiposo do paciente oncológico (ARGILÉS, *et al.*, 2008). Além disso, a caquexia está frequentemente associada à anorexia; condição essa que favore a redução do peso do paciente (MARTIGNONI, *et al.*, 2003).

No modelo experimental (figura 11), os animais portadores do tumor e alimentados com dieta padrão (W) apresentaram maior concentração plasmática de lactato, $2,06 \pm 0,10$, a qual foi 63,49% maior em relação ao grupo controle (C) $p < 0,05$. Os grupos WOP ($1,51 \pm 0,04$) e WOP+CAP ($1,46 \pm 0,06$) promoveram inibição da elevação da concentração de lactato (mmol/L) quando comparados ao grupo controle (C). Entretanto, no grupo WCAP ($1,8 \pm 0,12$), o mesmo efeito não foi observado, sugerindo que no grupo com tumor suplementado com óleo de peixe e tratado com capsaicina (WOP+WCAP), a diminuição do lactato sérico é atribuída ao óleo de peixe (WOP).

No câncer, o tumor é grande consumidor de glicose, pela glicólise anaeróbica na qual 1 mol de glicose produz 2 moles de Adenosina Trifosfato (ATP) e 2 moles de lactato. Na resíntese do lactato em glicose pelo ciclo de Cori no fígado são gastos 6 moles de ATP para produzir 1 mol de glicose (gliconeogênese), evento esse que aumenta a demanda energética para essa conversão (BONGAERTS, *et al.*, 2006). Assim sendo, reverter o ciclo de Cori parece ser uma estratégia favorável para a manutenção das reservas energéticas e minimização do crescimento tumoral.

Em adição, na carcinogênese, o sistema imunológico favorece a inflamação crônica; estado esse responsável por mudanças no eixo hipotalâmico-hipofisário, disautonomia, hipermetabolismo, estresse oxidativo, diminuição da síntese protéica muscular e aumento da proteólise muscular mediada pelo sistema ubiquitina proteassomo, em associação com o aumento da resistência à insulina nos tecidos periféricos (FERNANDES, *et al.*, 1999). As citocinas pro-inflamatórias TNF- α e IL-6

no plasma, favorecem a perda de peso, aumento da resposta de proteína de fase aguda, quebra de proteínas e gordura, aumento da concentração de cortisol e glucagon, resistência à insulina, anemia e febre (FERNANDES, *et al.*, 1999; BARBER, 2001; TOGNI, OTA, *et al.*, 2003). A produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-2, Inteferon γ (INF- γ), TNF- α e IL-6 são observadas em pacientes oncológicos com caquexia (MORLEY, *et al.*, 2006). E por se tratar de processo catabólico profundo, os estoques de proteínas, carboidratos e lipídios encontram-se alterados (MACDONALD, 2003). Ocorre ainda acidemia láctica pelo aumento da concentração de lactato circulante, modificações na tolerância à glicose e gliconeogênese hepática alterada (ARGILÉS, *et al.*, 1997).

5.1.2 Concentração plasmática de lactato

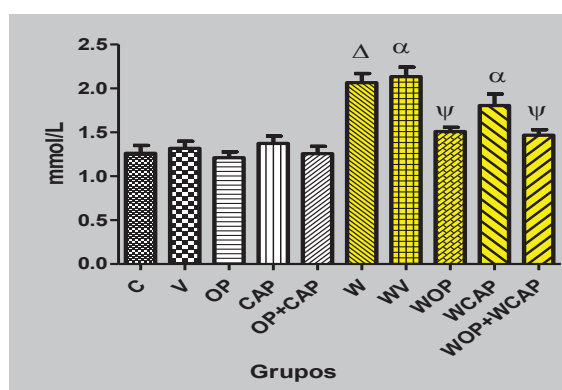


FIGURA 11: Concentração plasmática de lactato (mmol/L) dos animais sem tumor alimentados com dieta padrão (C), tratados com veículo (V), suplementados com óleo de peixe (OP), tratados com capsaicina (CAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (OP+ CAP), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (WOP), tratados com capsaicina (WCAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+ WCAP). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média de 15 animais por grupo.

Δ $p < 0,05$ vs. C, Ψ $p < 0,05$ vs. W, α $p < 0,05$ vs. respectivo controle sem tumor

C	V	OP	CAP	OP+CAP
1,26 \pm 0,08	1,31 \pm 0,08	1,21 \pm 0,06	1,37 \pm 0,08	1,25 \pm 0,08

W	WV	WOP	WCAP	WOP+WCAP
2,06 \pm 0,10	2,13 \pm 0,10	1,51 \pm 0,04	1,8 \pm 0,12	1,46 \pm 0,06

Outro importante parâmetro bioquímico indicativo de caquexia no modelo do tumor de Walker 256 é o conteúdo de glicogênio hepático (figura 12). No câncer, a

célula tumoral usa particularmente a glicose como substrato energético, aumentando o seu consumo no organismo. O fígado aumenta a atividade da gliconeogênese, usando como substrato os aminoácidos musculares e o lactato. Nesse processo, ocorre gasto de ATP, o que leva a espoliação energética, corroborando com a degradação tecidual e perda de peso e de massa corpórea dos pacientes com câncer (INUI, 2002). Em adição, algumas alterações enzimáticas podem ser verificadas. Carcinoma hepatocelular, metástases, tumores ósseos podem promover aumento da fosfatase alcalina. O aumento das aminotransferases, que trabalham na síntese e degradação de aminoácidos, pode estar relacionado a lesões ou destruição de células hepáticas. Pequenas variações da gama-glutamyl-transferase direcionam para desordens hepáticas, neoplasmas, esteatose hepática e câncer de próstata. A lactato desidrogenase está frequentemente relacionada a processos malignos, principalmente quando há metástases hepáticas (CARAWAY, 1959; BELFIELD & GOLDBERG, 1968; POSEN & DOHERTY, 1981; BODANSKY, 1972; MAYNE, *et al.*, 1994; COHEN & KAPLAN, 1979; KARMEN, 1955; ROSALKI, 1975; STURK & SANDERS, 1990).

Dentro desse contexto, a investigação do conteúdo de glicogênio hepático apresenta relevância significativa uma vez que os tratamentos propostos podem alterar o padrão de espoliação energética induzido pelo câncer. Assim, os animais sem tumor e submetidos a diferentes suplementações e tratamentos (V, OP, CAP, OP+CAP), não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle (C, $167,7 \pm 2,48 \mu\text{mol/g}$ de tecido). Entretanto, a presença do tumor promoveu significativa ($p < 0,05$) depleção das reservas de glicogênio hepático no grupo W ($113,7 \pm 1,293 \mu\text{mol/g}$ de tecido).

As suplementações com óleo de peixe (WOP, $142,3 \pm 2,437 \mu\text{mol/g}$ de tecido) e capsaicina em associação com óleo de peixe (WOP+WCAP, $143,1 \pm 2,136 \mu\text{mol/g}$ de tecido) propiciaram conservação significativa do glicogênio hepático quando comparados aos seus grupos controles sem tumor (OP, OP+CAP). Entretanto, o grupo tratado com a capsaicina (WCAP) não apresentou conservação significativa do conteúdo de glicogênio hepático (WCAP $112,2 \pm 1,451$), apresentando resultados semelhantes ao grupo W.

5.1.3 Conteúdo de glicogênio hepático

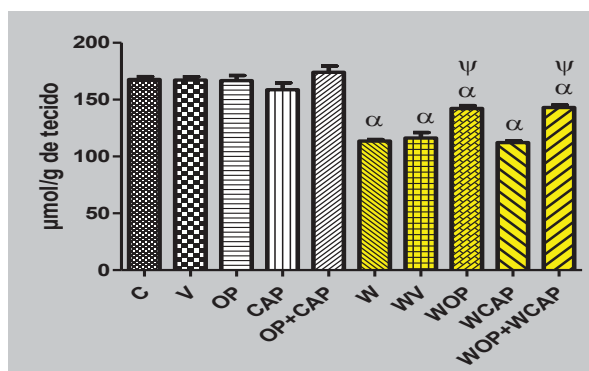


FIGURA 12: Conteúdo hepático de glicogênio ($\mu\text{mol/g}$ de tecido) dos animais sem tumor alimentados com dieta padrão (C), tratados com veículo (V), suplementados com óleo de peixe (OP), tratados com capsaicina (CAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (OP+ CAP), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (WOP), tratados com capsaicina (WCAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+ WCAP). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média de 15 animais por grupo. α $p < 0,05$ vs. respectivo controle sem tumor, Ψ $p < 0,05$ vs. W

C	V	OP	CAP	OP+CAP
167,7 \pm 2,48	167,3 \pm 2,76	166,7 \pm 4,585	158,8 \pm 6,029	174,0 \pm 5,533

W	WV	WOP	WCAP	WOP+WCAP
113,7 \pm 1,293	116,2 \pm 4,948	142,3 \pm 2,437	112,2 \pm 1,451	143,1 \pm 2,136

Os dados referentes às concentrações plasmáticas, em jejum, de glicose dos animais sem tumor e portadores de tumor estão apresentadas nas figuras 13. A redução das taxas glicêmicas em animais portadores de tumor (W) ocorre devido à avidéz do tumor pela glicose, o que se correlaciona a intensa mobilização das reservas de glicogênio e intensa gliconeogênese hepática como já discutido (TISDALE, 2005).

Animais sem tumor alimentados com dieta padrão (C) e os submetidos às diferentes suplementações com óleo de peixe (OP), capsaicina (CAP), óleo de peixe em associação com capsaicina (OP+ CAP), não tiveram alteração da glicemia a qual ficou em torno de 91,18 mg/dL. Os animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W) apresentaram redução de 26% na concentração de glicose plasmática quando comparados aos animais controle (C) ($p < 0,05$). As suplementações com óleo de peixe (WOP) e óleo de peixe com capsaicina (WOP+WCAP) impediram a queda da glicemia quando comparadas a glicemia dos

animais do grupo W, mostrando valores semelhantes aos animais sem tumor (C,V, OP,CAP, OP+CAP). Em contrapartida, a capsaicina (WCAP) quando administrada isoladamente não foi capaz de promover o mesmo efeito.

5.1.4 Glicemia

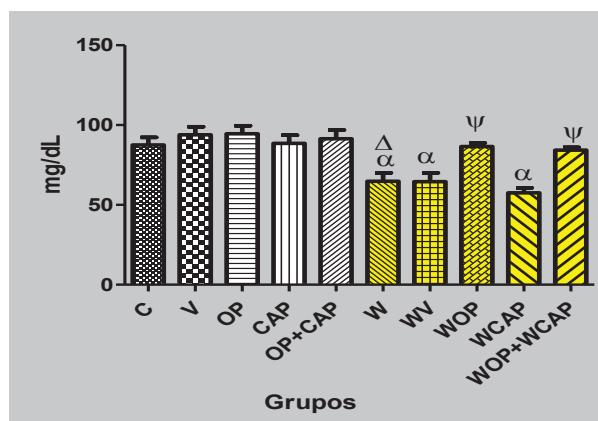


FIGURA 13: Concentração plasmática de glicose (mg/dL) dos animais sem tumor alimentados com dieta padrão (C), tratados com veículo (V), suplementados com óleo de peixe (OP), tratados com capsaicina (CAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (OP+ CAP), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (WOP), tratados com capsaicina (WCAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+ WCAP). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo.

Δ $p < 0,05$ vs. C, α $p < 0,05$ vs. respectivo controle sem tumor, Ψ $p < 0,05$ vs. W

C	V	OP	CAP	OP+CAP
87,5 \pm 4,85	93,9 \pm 5,04	94,5 \pm 5,05	88,6 \pm 5,13	91,4 \pm 5,52

W	WV	WOP	WCAP	WOP+WCAP
64,8 \pm 5,32	64,6 \pm 5,43	86,5 \pm 2,32	57,5 \pm 3,22	84,3 \pm 1,8

Os animais sem tumor alimentados com dieta padrão (C) e submetidos às diferentes suplementações e suas associações, não apresentaram diferença significativa quanto à triacilglicerolemia ($p > 0,05$), a qual se encontrou na média de 62,14 mg/dL (figura 14).

Diante da presença do tumor, os animais alimentados com dieta padrão (W) apresentaram concentração de triacilgliceróis de 112,5 \pm 4,14, a qual foi 88% maior quando comparada ao grupo controle ($p > 0,05$). As suplementações com óleo de peixe (WOP), capsaicina isolada (WCAP) e capsaicina combinada com o óleo de peixe (WOP+WCAP) impediram o aumento da concentração plasmática de

triacilgliceróis plasmáticos, ficando essa ao redor de 58,23 mg/dL. Os dados sugerem que tanto a capsaicina quanto o óleo de peixe apresentam efeito protetor na manutenção da reserva energética do indivíduo, o que apresenta relevância significativa considerando-se as complicações relacionadas à síndrome caquética.

Essa tendência pode ser corroborada por trabalhos experimentais nos quais citocinas pró-inflamatórias produzidas pelo indivíduo portador de tumor são capazes de reduzir a atividade da enzima lipoproteína lipase (LPL) nos vasos do tecido adiposo e hepático, o que resulta em hipertriacilglicerolemia (MORLEY, *et al.*, 2006).

As pesquisas realizadas nos últimos anos mostram que alterações no perfil plasmático de carboidratos, lipídeos e metabólicos, são manifestações presentes em portadores de tumor (TISDALE, 2009). A hipoglicemia, hiperlactatemia e finalmente a hipertriacilglicerolemia, caracterizam a síndrome da caquexia, a qual pode ser revertida pelo óleo de peixe (FERNANDES, *et al.*, 1999; TOGNI, OTA, *et al.*, 2003; PIZATO, *et al.*, 2005; FOLADOR, *et al.*, 2006; AIKAWA, *et al.*, 2008).

5.1.5 Triacilglicerolemia

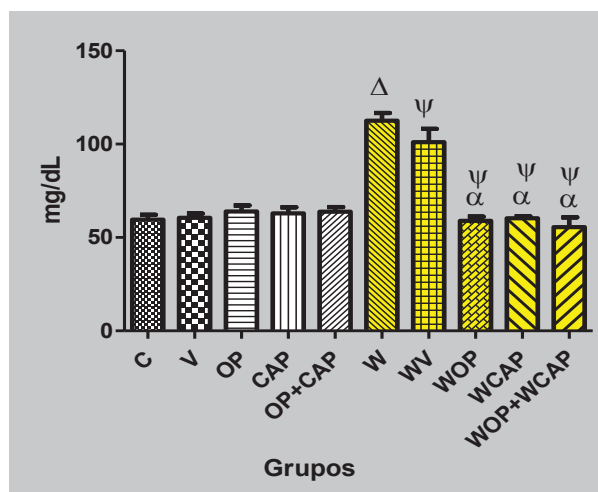


FIGURA 14: Concentração plasmática de triacilgliceróis (mg/dL) dos animais sem tumor alimentados com dieta padrão (C), tratados com veículo (V), suplementados com óleo de peixe (OP), tratados com capsaicina (CAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (OP+ CAP), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (WOP), tratados com capsaicina (WCAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+ WCAP). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo.

Δ $p < 0,05$ vs. C, α $p < 0,05$ vs. W, Ψ $p < 0,05$ vs. respectivo controle sem tumor.

C	V	OP	CAP	OP+CAP
59,6±2,57	60,5±2,37	63,9±3,29	62,9±3,33	63,8±2,57

W	WV	WOP	WCAP	WOP+WCAP
112,5±4,14	101±7,18	58,90±2,228	60,30± 0,98	55,50± 5,279

Assim sendo, os dados confirmam as propriedades do óleo de peixe indicadas por diversos estudos experimentais. De acordo com os mesmos, o óleo de peixe reduz o crescimento tumoral, induz a menor depleção de massa corpórea, maior taxa glicêmica, menor lactatemia e triacilglicerolemia, menor resistência à insulina e ainda, maior reserva de glicogênio hepático e muscular (TOGNI, *et al.*, 2003; PIZATO, *et al.*, 2005; FOLADOR, *et al.*, 2006; IAGHER, 2008; BORGHETTI, 2010). Entretanto, o tratamento isolado com a capsaicina no modelo experimental não apresentou a mesma propriedade anti caquética.

Tabela 2: Peso corporal(g), peso tumoral(g), peso da carcaça(g) e mudança de peso (g) dos animais sem tumor alimentados com dieta padrão (C), tratados com veículo (V), suplementados com óleo de peixe (OP), tratados com capsaicina (CAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (OP+ CAP), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (WOP), tratados com capsaicina (WCAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+ WCAP). Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média de 15 animais por grupo.

Grupo	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Peso do tumor (g)	Peso da carcaça (g)	Mudança de peso (g)
(C)	216,9± 4,42	237,9±4,43	-	237,9±4,43	+21,00±0,66
(V)	221,5± 2,59	240,2±2,42	-	240,2±2,42	+18,67±0,59
(OP)	224,4± 2,11	242,3±1,99	-	242,3±1,99	+17,93±0,39
(CAP)	219,6± 2,98	239,5±3,00	-	239,5±3,00	+19,93±0,30
(OP+CAP)	215,5± 4,94	233,8±4,50	-	233,8±4,50	+18,33±0,70
(W)	215,4± 4,91	197,4±4,32	18,47±0,41	178,7±4,30	-18,00±1,69
(WV)	224,1± 5,16	210,1±3,52	17,60±0,54	192,7±3,61 ^α	-14,07±5,26
(WOP)	220,1± 1,75	237,2±2,49	8,48±0,31 ^α	228,4±2,59 ^α	+17,13±1,64 ^α
(WCAP)	224,3± 1,71	211,5±2,07	9,35±0,62 ^{αΩ}	201,2±2,53 ^{αΩ}	-12,80±2,14 ^{αΩ}
(WOP+WCAP)	217,7± 4,27	236,4±3,82	10,09±0,71 ^{αΩ∞}	225,8±3,69 ^{αΩ∞}	+18,73±1,42 ^{α∞}

α p<0,05 vs. W; Ω p<0,05 vs. WOP; ∞ p<0,05 vs. WCAP

Nos animais sem tumor, ao final de 15 dias foi observado ganho de peso de aproximadamente 20g, independentemente do tipo de suplementação e tratamento administrado. Nos animais com tumor, para a averiguação da massa corpórea final, fez-se necessário subtrair o peso do tumor da massa corpórea do animal ao final

de 15 dias após a inoculação das células tumorais (peso da carcaça). Esse procedimento permitiu observar que nos animais alimentados com dieta padrão portadores de tumor (W), houve perda de massa corpórea de 18g, a qual foi significativamente diferente quando comparada à dos animais sem tumor ($p < 0,05$).

O óleo de peixe (WOP) impediu a perda significativa de massa corpórea, dado esse que foi observado nos portadores de tumor sem suplementação ($p < 0,05$ vs W). E ainda, promoveu ganho de 17,13g ao final de 15 dias, retardando dessa forma a síndrome caquética a qual apresenta forte associação com a perda de peso do indivíduo. O mesmo foi observado nos animais suplementados com o óleo de peixe e tratados com a capsaicina (WOP+WCAP), sendo verificado ganho de 18,73g durante o período de indução da caquexia mediado pelo tumor de Walker 256. Entretanto, o mesmo não foi observado no grupo tratado isoladamente pela capsaicina, a qual teve redução de 12,80g quando comparado ao grupo W, porém relevante no processo oncológico. De forma concisa, os efeitos das diferentes suplementações sobre os parâmetros de caquexia encontram-se analisados na tabela 3.

Tabela 3: Resumo dos efeitos das diferentes suplementações em relação ao grupo controle, sobre os parâmetros de caquexia induzidos pelo tumor de Walker 256, dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (WOP), tratados com capsaicina (WCAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+ WCAP).

Suplementação/ Tratamento	CAQUEXIA ONCOLÓGICA				
	Glicemia	Triacilglicerolemia	Lactatemia	Glicogênio hepático	Massa corpórea
Walker(W)	Diminui	Eleva	Eleva	Diminui	Reduzida
Veículo(WV)	Diminui	Eleva	Eleva	Diminui	Reduzida
Óleo de Peixe(WOP)	Não alterou	Não alterou	Não alterou	Diminui	Elevada
Capsaicina(WCAP)	Diminui	Não alterou	Elevou	Diminui	Reduzida
Óleo de peixe + capsaicina (WOP+WCAP)	Não alterou	Não alterou	Não alterou	Diminui	Elevada

Dentro do modelo estudado, os grupos WOP, WCAP e WOP+WCAP promoveram redução da capacidade proliferativa das células do tumor de Walker 256 respectivamente de 30%, 32% e 28% quando comparados ao grupo controle (W) (figura 15). Assim, tanto o óleo de peixe isolado (WOP), quanto a capsaicina isolada (WCAP) promoveram redução na proliferação de células tumorais quando comparados ao grupo controle (W). No grupo em que foi administrado concomitantemente capsaicina com óleo de peixe (WOP+WCAP), apesar de haver diminuição da proliferação das células tumorais, não foi verificado efeito aditivo.

5.1.6 Proliferação de células tumorais *in vivo*

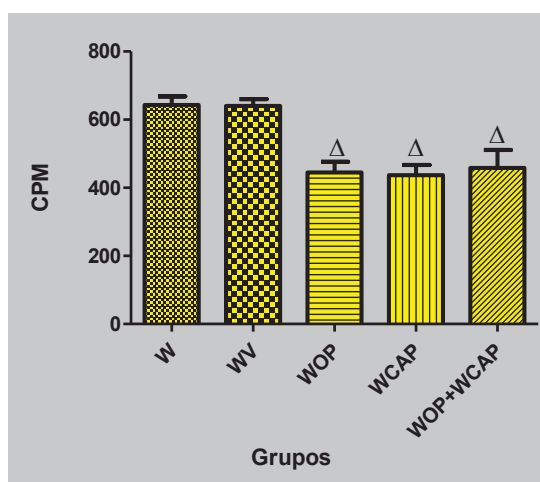


FIGURA 15: Proliferação de células tumorais (cpm) *ex vivo*, obtidas dos animais alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (OP), tratados com capsaicina (CAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+ WCAP). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média de 10 animais por grupo. $\Delta p < 0,05$ vs. W

W	WV	WOP	WCAP	WOP+WCAP
643,2 \pm 25,37	640,6 \pm 19,85	445,21 \pm 31,21	437,07 \pm 29,74	458,6 \pm 52,10

Tanto o EPA, quanto o DHA, ricamente presentes no óleo de peixe, apresentam propriedades anti-proliferativas em células do tumor de Walker 256, *in vivo* (TOGNI, *et al.*, 2003; PINTO JR, *et al.*, 2004; PIZATO, *et al.*, 2005; MUND, *et al.*, 2007, SCHIESSEL, 2011) e *in vitro* (OLIVEIRA, 2006). Tais efeitos, também podem ser observados em culturas de linhagens de células cancerosas *in vitro* (LLOR, *et al.*, 2003; ANDERSON, *et al.*, 2009; YANG, *et al.*, 2012). A ação anti-

proliferativa atribuída ao óleo de peixe decorre da ação dos ácidos graxos EPA e DHA sobre as vias de proliferação. Uma vez incorporados nas membranas de células tumorais, esses ácidos graxos modificam as vias de sinalização; processo esse que se associa a redução da taxa proliferativa (LARSSON, *et al.*, 2004). Assim, mudanças na fluidez da membrana interferem no modo como os fatores de crescimento, citocinas e hormônios interagem com seus receptores e nos resultantes sinais de transdução através de segundos mensageiros (BERQUIN, *et al.*, 2008).

O estudo das propriedades antiproliferativas da capsaicina, bem como seus efeitos nos vários estágios da carcinogênes e mutagênese é considerada recente. Seus efeitos podem ser observados em células malignas de próstata (MALAGARIE-CAZENAVE, *et al.*, 2011; MORI, *et al.*, 2006), cólon (LEE, *et al.*, 2012), da glia (KIM, *et al.*, 2010), esôfago (WU, *et al.*, 2006), mama (MOON, *et al.*, 2012), pancreáticas (ZHANG, *et al.*, 2008), gástricas (KIM, *et al.*, 2010) e leucêmicas (TSOU, *et al.*, 2006).

A avaliação da apoptose dos grupos estudados revelou que óleo de peixe (WOP) foi capaz de promover maior indução de apoptose na população estudada. A apoptose induzida pelo óleo de peixe foi significativamente maior no grupo WOP quando comparada à do grupo W, e ainda grupos tratados com capsaicina isoladamente ou ainda combinado com o óleo de peixe.

Tabela 4: Percentual (%) de células apoptóticas, necróticas e viáveis determinado por citometria de fluxo, dos tumores dos animais alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (OP), tratados com capsaicina (CAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+ WCAP). Os dados estão apresentados como média \pm EPM de quatro experimentos, 10 animais.

grupos	células apoptóticas (%)	células necróticas(%)	células viáveis (%)
W	12,52 \pm 0,79 ^{Δ}	2,84 \pm 0,11	84,01 \pm 0,1
WV	11,62 \pm 0,78	3,01 \pm 0,05	83,30 \pm 0,5
WOP	39,37 \pm 1,05 ^{Δ}	2,86 \pm 0,03	57,12 \pm 0,7 ^{Δ}
WCAP	23,55 \pm 0,91 ^{$\Delta\alpha$}	3,01 \pm 0,06	70,15 \pm 0,1 ^{$\Delta\alpha$}
WOP+WCAP	42,99 \pm 2,53 ^{$\Delta\Psi$}	2,99 \pm 0,06	54,12 \pm 0,4 ^{$\Delta\Psi$}

Δ p<0,05 vs.W; α p<0,05 vs. WOP; Ψ p<0,05 vs. WCAP

O EPA e DHA se associam a inativação da família de genes Bcl-2 e ao aumento da transcrição de genes e fatores de transcrição que induzem a apoptose (HARDMAN, 2002). Os genes da família Bcl-2 codificam proteínas anti-apoptose tais como Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bim, Bik, Hrk, Bcl-Xs, APR, p193, Bcl-G, Nip3 e Nix.

As proteínas anti-apoptóticas suprimem a liberação da proteína ativadora de caspase (citocromo c), enquanto que proteínas anti-apoptóticas como a família da Bcl-2 induzem ou facilitam a liberação da proteína c (REED, 2000). Nos estudos conduzidos por Iagher (2008), foi demonstrado que a proteína pró-apoptótica Bax encontra-se aumentada no tecido tumoral de ratos suplementados com óleo de peixe quando comparados com o grupo (W), o qual recebeu apenas dieta padrão. Assim, os animais portadores de tumor e suplementados com o óleo de peixe apresentaram maior relação Bax/Bcl-2 comparativamente ao grupo não suplementado portador de tumor (cerca de 3,8 vezes).

Entretanto, apesar do grupo suplementado com óleo de peixe ter apresentado efeito apoptótico superior em relação aos demais grupos, tanto a capsaicina (WCAP) isolada quando combinada com o óleo de peixe (WOP+WCAP) também estimularam a apoptose em relação ao grupo controle. Um dos mecanismos propostos pelos quais a capsaicina promove a supressão do crescimento tumoral é a indução de apoptose e parada do ciclo celular na fase G_0/G_1 em células tumorais, causadas mediante o aumento das concentrações de Ca^{2+} intracelular e de espécies reativas de oxigênio, alteração do potencial de membrana mitocondrial, liberação do citocromo c, ativação da caspase 3, aumento na expressão da Bax, e redução das concentrações da Bcl-2 (KIM, *et al.*, 2009).

Células tratadas com capsaicina podem manifestar superexpressão da p 53 (MORI, *et al.*, 2006), proteína supressora de tumor que regula a resposta celular e danos ao DNA, interrompendo o ciclo celular, promovendo o reparo do DNA e morte celular (GRIVICICH, *et al.*, 2007).

Estudos experimentais mostram que a indução da apoptose gerada pela capsaicina é iniciada pelas EROS. Em seguida, ocorre expressão da Bax, alteração do potencial de membrana mitocondrial e liberação do citocromo c e fator indutor de apoptose (AIF) no citosol, o que é responsável pela ativação da cascata das caspases 9 e 3 (ZHANG, *et al.*, 2008).

Outro mecanismo desempenhado pela capsaicina é o bloqueio da degradação da $I\kappa B\alpha$. A família dessa proteína tem a responsabilidade de manter o fator nuclear NF- κB inativo no citoplasma (MORI, *et al.*, 2006)

Agentes carcinogênicos podem ativar o NF- κB , causando a translocação do fator para o núcleo, onde o mesmo é responsável pela regulação da expressão de vários genes envolvidos na tumorigênese (MAITY, *et al.*, 2010). Assim, a capsaicina impede a ativação do NF- κB . Em adição, em estudos experimentais a capsaicina bloqueou o fator de transcrição STAT-3, que pertence a um grupo de proteínas responsáveis pela expressão de produtos relacionados à sobrevivência celular, proliferação, quimioresistência e angiogênese (AGARWAL, *et al.*, 2008; BHUTANI, *et al.*, 2007). Interessantemente, as propriedades relacionadas acima não tiveram relação direta com a ativação do receptor vanilóide TRPV1, indicando outro alvo celular (MORI, *et al.*, 2006; LEE, *et al.*, 2000).

O número de células tumorais apoptóticas, necróticas e viáveis, expresso em porcentagem (%), está apresentado na tabela 4. Nos tumores obtidos dos animais alimentados com dieta padrão (W), o número de células viáveis foi de aproximadamente 84%, as células em apoptose atingiram 12% e em necrose, aproximadamente 3%. Valores semelhantes foram alcançados pelo grupo WV. Entretanto, a suplementação com o óleo de peixe, foi capaz de reduzir a população de células viáveis para 57%, enquanto que o número de células apoptóticas aumentou 3,14 vezes em relação ao grupo W. Nesse mesmo grupo, a taxa de células necróticas indicadas foi de $2,86 \pm 0,03$. Assim, o óleo de peixe induziu o melhor percentual de apoptose entre os grupos estudados. O tratamento com a capsaicina (WCAP) também elevou o percentual de células apoptóticas em 1,87 vezes comparativamente ao grupo W. A capsaicina não foi capaz de alterar o percentual de maneira significativa das células necróticas, e o percentual de células viáveis permaneceu na faixa de 70,15%. E por último, no grupo suplementado com o óleo de peixe em associação com a capsaicina (WOP+WCAP), o percentual de células vivas foi de 54,12%. As células apoptóticas foram 3,43 vezes maiores que o grupo controle, e 1,82 vezes maior em relação à WCAP. As células necróticas permaneceram na faixa aproximadamente 2,99%.

Parâmetros imunológicos

O padrão dietético exerce papel fundamental no desenvolvimento, manutenção e funcionamento do sistema imunitário. A deficiência e o excesso de nutrientes afetam tanto o número quanto as atividades desenvolvidas pelas células imunológicas (KELLEY, 2001). Diante do desafio proporcionado pelo câncer, otimizar o padrão de atividade dessas células de modo que as mesmas possam retardar o avanço do câncer sem promover prejuízos aos diversos sistemas, é uma perspectiva positiva diante da gravidade do quadro. Em nosso projeto, linfócitos, macrófagos e neutrófilos foram escolhidos dados a sua relevância na manutenção das barreiras imunológicas.

Os linfócitos apresentam grande capacidade proliferativa e produzem múltiplas citocinas regulatórias, possuindo dessa maneira importante papel na resposta imunitária, assim como em sua regulação (DELVES, *et al.*, 2000). O mesmo efeito pode ser observado na figura 16, na qual são apresentados os dados referentes a proliferação de linfócitos do linfonodo mesentérico obtidos de ratos sem e com tumor de Walker 256, na situação basal e na presença de con A. Na condição basal, a suplementação com o óleo de peixe (OP, $211,4 \pm 15,49$) foi estatisticamente diferente quando comparada à do grupo controle (C, $386,7 \pm 21,41$). O mesmo perfil foi verificado nos grupos capsaicina (CAP, $210,2 \pm 11,99$) e óleo de peixe em associação com a capsaicina (OP+ CAP, $213,5 \pm 11,60$). Diante da presença do mitógeno, houve aumento significativo da proliferação em todos os grupos, sendo de aproximadamente 2 vezes no controle (C). A suplementação com o óleo de peixe (OP) elevou a proliferação linfocitária em 4,5 vezes, enquanto que a suplementação com a capsaicina (CAP) e óleo de peixe e capsaicina (OP+CAP) elevaram a proliferação em 3, 8 e 4 vezes, respectivamente.

Na presença do tumor e ausência do estímulo, os grupos suplementados com óleo de peixe (WOP, $270,4 \pm 4,893$), capsaicina (WCAP, $291,3 \pm 25,92$) e óleo de peixe em associação com a capsaicina (WOP+WCAP, $305 \pm 12,60$) mostraram-se diferentes estatisticamente ($p < 0,05$) quando comparados aos grupos controle (C, $594,8 \pm 46,91$). Diante da exposição ao mitógeno, a maior proliferação foi observada no grupo W/Con A, a qual foi 3 vezes maior quando comparada à do grupo W. Nos grupos óleo de peixe (WOP) e capsaicina (WCAP) a proliferação elevou-se respectivamente em 3,4 e 2,8 vezes. No grupo suplementado com óleo de peixe em

associação com a capsaicina (WOP+WCAP), a elevação da proliferação foi de 3 vezes em relação ao grupo sem estímulo (WOP+WCAP).

5.1.7 Proliferação linfocitária

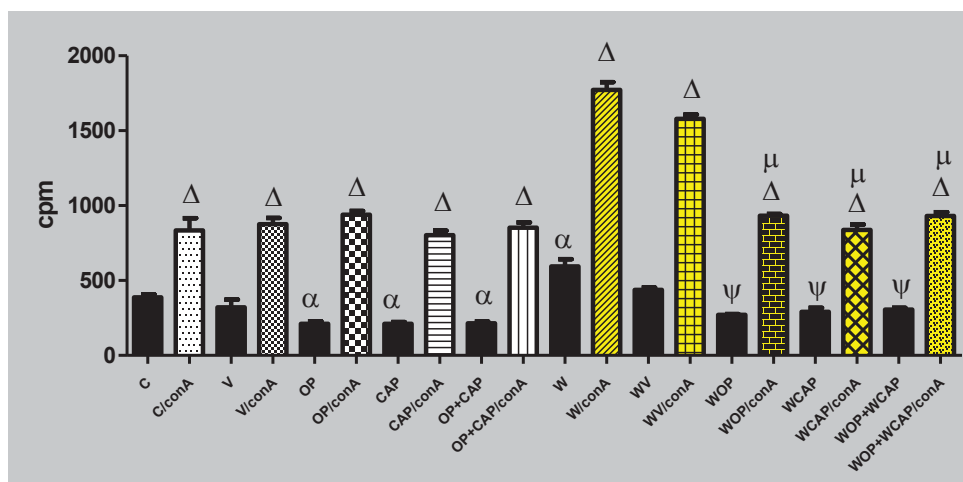


FIGURA 16: Proliferação de linfócitos mesentéricos (cpm), na ausência e presença de concanavalina A (conA), obtidos dos animais do grupo sem tumor alimentados com dieta padrão (c), , tratados com veículo (V), suplementados com óleo de peixe (OP), tratados com capsaicina (CAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (OP+ CAP), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (WOP), tratados com capsaicina (WCAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+ WCAP). Os dados representam a média ± epm de 6 cultivos por grupo. Δ p< 0,05 vs. ausência de conA; α p< 0,05 vs. C; ; Ψ p< 0,05 vs. W; μ p< 0,05 vs. W/ConA.

C	C	V	V	OP	OP	CAP	CAP	OP+CAP	OP+CAP
	/conA		/conA		/conA		/conA		/conA
386,7± 21,41	834± 81,45	320,4± 52,01	875,2± 42,00	211,4± 15,49	939,3± 24,18	210,2± 11,99	801,9± 29,91	213,5± 11,60	852,6± 34,90

W	W	WV	WV	WOP	WOP	WCAP	WCAP	WOP+	WOP+
	/conA		/conA		/conA		/conA	WCAP	WCAP
									/conA
594,8± 46,91	1772,5± 50,84	436,7± 15,55	1578,7± 29,25	270,4± 4,893	932,3± 11,88	291,3± 25,92	836,7± 37,41	305± 12,60	931,5± 24,78

A quantificação de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ estão apresentadas nas figuras 17 e 18. Os resultados revelam que as diferentes suplementações e associações administradas tanto na ausência (OP, CAP, OP+CAP) quanto na presença de tumor

(WOP, WCAP, WOP+WCAP) não promoveram diferença estatística em relação aos seus respectivos controles (C e W).

5.1.8 Quantificação de linfócitos CD4+ do linfonodo mesentérico

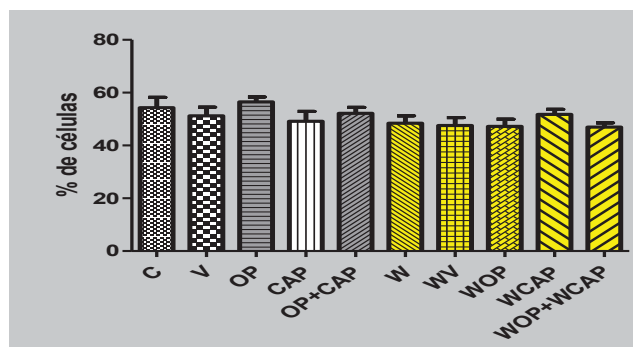


FIGURA 17: % de linfócitos CD4+ do linfonodo mesentérico de animais sem tumor alimentados com dieta padrão (C), tratados com veículo (V), suplementados com óleo de peixe (OP), tratados com capsaicina (CAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (OP+ CAP), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (WOP), tratados com capsaicina (WCAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+ WCAP). Os dados são apresentados como média \pm EPM de 15 animais por grupo.

C	V	OP	CAP	OP+CAP
54,33 \pm 3,89	51,26 \pm 3,22	56,53 \pm 1,8	49,13 \pm 3,77	52,13 \pm 2,32

W	WV	WOP	WCAP	WOP+WCAP
48,4 \pm 2,86	47,6 \pm 2,98	47,2 \pm 2,786	51,73 \pm 1,999	46,93 \pm 1,611

O mesmo não foi verificado na quantificação de linfócitos CD8+ também obtidos do linfonodo mesentérico. Não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos sem tumor. Entretanto, quando os animais foram expostos a presença do tumor de Walker 256, o grupo não suplementado e alimentados com dieta padrão (W) apresentou-se 20% menor quando comparado ao grupo controle sem tumor (C). Em contrapartida, as suplementações com WOP, WCAP, WOP+WCAP elevaram o percentual de células CD8+ de maneira significativa ($p < 0,05$). O óleo de peixe elevou a quantificação de linfócitos CD8+ em aproximadamente 60%, enquanto que a capsaicina isolada (WCAP), ou ainda em associação com o óleo de peixe (WOP+WCAP) promoveram uma elevação de 62% e 58% em relação ao grupo Walker (W).

O maior numero de linfócitos CD8 apresenta relevância significativa no câncer. De fato, o principal mecanismo de defesa anti-tumoral é a morte de células neoplásicas pelos linfócitos TCD8, também chamados de T citotóxicos (LTC). Os mesmos reconhecem e matam células potencialmente malignas que expressam peptídeos derivados de proteínas celulares mutantes ou proteínas virais oncogênicas associadas ao MHC classe I (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Tanto linfócitos CD8 quanto CD4 podem ser ativados por tumores, dependendo da via que será acionada, porém o controle do tumor resulta tanto da magnitude da resposta imunológica inicial, quanto da capacidade de sustentar essa resposta por um período prolongado (SABEL, *et al.*, 2005).

Os linfócitos TCD4 parecem estar mais relacionados com a produção de TNF pelos macrófagos e INF γ pela população Th1, podendo ser responsável pela maior expressão da MHC-I pelas células neoplásicas, o que resulta na sensibilização de linfócitos TCD8 e consequente lise pelo sistema perforina/granzima (CHANG, *et al.*, 2005). Entretanto, cabe ressaltar que o aumento da concentração de linfócitos CD8 e CD4 já foram relacionados tanto com a transformação quanto progressão do câncer oral (GANNOT, *et al.*, 2004). A própria quantidade dos linfócitos CD8 foi associada com o grau de diferenciação no câncer de pulmão, indicando números superiores quando as células encontravam-se indiferenciadas (MORI, *et al.*, 2000).

Daniel *et al.* (2003) evidenciaram concentrações elevadas de linfócitos CD4 na transformação de lesões pré-cancerosas para o câncer de pele.

A razão CD4/CD8 encontra-se apresentada na figura 19. Não houve diferença significativa entre a razão CD4/CD8 dos grupos sem tumor. Entretanto, quando os animais foram desafiados com a presença do tumor, a razão CD4/CD8 foi significativamente menor ($p < 0,05$) nos grupos WOP, WCAP, WOP+WCAP em relação ao grupo W. Chang *et al.* (2005) apresentaram, em seu estudo, que a relação CD4/CD8 mostrava-se menor nas displasias moderadas e severas, comparativamente as displasias leves. Nesta mesma revisão, foi citado que uma relação menor que 1 seria preditiva de metástase em linfonodo.

4.1.9 Quantificação de linfócitos CD8+ do linfonodo mesentérico

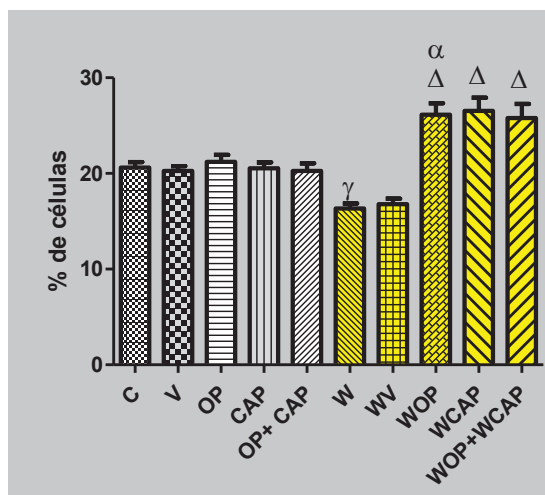


FIGURA 18: % de linfócitos CD8+ do linfonodo mesentérico de animais sem tumor alimentados com dieta padrão (C), tratados com veículo (V), suplementados com óleo de peixe (OP), tratados com capsaicina (CAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (OP+ CAP), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (WOP), tratados com capsaicina (WCAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+ WCAP). Os dados são apresentados como média \pm EPM de 15 animais por grupo.

γ $p < 0,05$ vs. C

Δ $p < 0,05$ vs. W;

α $p < 0,05$ vs. OP;

C	V	OP	CAP	OP+CAP
20,6±0,58	20,26±0,49	21,2±0,73	20,53±0,63	20,26±0,80

W	WV	WOP	WCAP	WOP+WCAP
16,33±0,53	16,8±0,57	26,13±1,21	26,53±1,37	25,8±1,46

5.1.10 Razão CD4+/CD8+ de linfócitos do linfonodo mesentérico

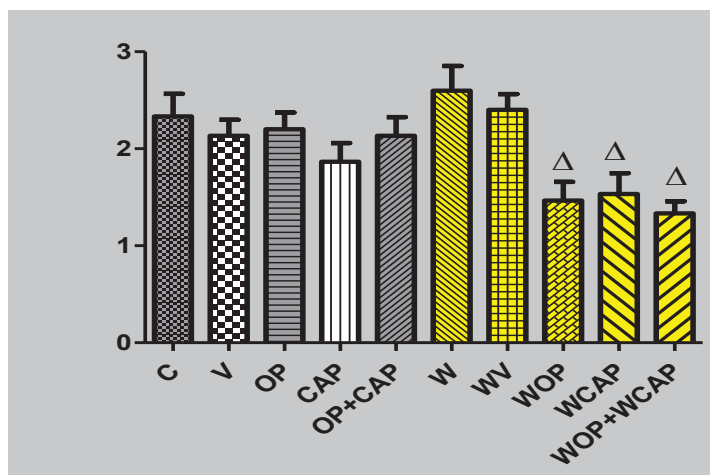


FIGURA 19: Razão CD4+/CD8+ de linfócitos do linfonodo mesentérico dos grupos alimentados com dieta padrão (C), tratados com veículo (V), suplementados com óleo de peixe (OP), tratados com capsaicina (CAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (OP+ CAP), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (WOP), tratados com capsaicina (WCAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+ WCAP). Os dados são apresentados como média \pm EPM de 15 animais por grupo.

$\Delta p < 0,05$ vs. W

C	V	OP	CAP	OP+CAP
2,33 \pm 0,23	2,13 \pm 0,16	2,2 \pm 0,17	1,86 \pm 0,19	2,13 \pm 0,19

W	WV	WOP	WCAP	WOP+WCAP
2,6 \pm 0,25	2,4 \pm 0,16	1,46 \pm 0,19	1,53 \pm 0,21	1,33 \pm 0,12

Macrófagos são células da primeira linha de defesa do sistema imunitário (COUTINHO, 2004) cujo papel é relevante no processo inflamatório, assim como no controle do surgimento de células tumorais (TANG, *et al.*, 2000). Desempenham papel importante nas respostas imunes inatas e adaptativa, e são ativados por produtos microbianos como as endotoxinas e por citocinas das células T como o IFN- γ . Quando ativados, eliminam microorganismos pela fagocitose, produzem citocinas pró-inflamatórias e apresentam antígenos às células T CD4 (SOEIRO, *et al.*, 1994). A fagocitose também faz parte do conjunto de defesa mediado pelos neutrófilos. Além desse mecanismo, os neutrófilos se utilizam da degranulação e produção de EROs para a manutenção da integridade imunológica (WELCH, *et al.*, 1996; KAUR, *et al.*, 2004). A fagocitose se inicia através do reconhecimento por

receptores dos fagócitos da estrutura a ser fagocitada (KIM, et al., 2003; STUART & EZEKOWITZ, 2008). Na endocitose ocorre a formação de um vacúolo chamado de fagossomo, formado pela invaginação da membrana plasmática (RITTIG, *et al.*, 1999). Após a internalização da estrutura alvo, o patógeno será destruído pela ação de EROs e enzimas lisossomais nos fagossomos (SZWEDA, *et al.*, 2002), além da apoptose (SCHÖNFELD & WOJTCZAK, 2008).

Os fagócitos são capazes de internalizarem microorganismos patogênicos, células tumorais e de promoverem destruição pela produção das EROS (WALLACE, *et al.*, 2003; GALLI & CALDER, 2009), incluindo o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (BELO, *et al.*, 2010).

Em nossos estudos experimentais, a fagocitose de macrófagos, retenção de vermelho neutro, produção de ânion superóxido e produção de óxido nítrico, na ausência e presença de tumor, encontram-se apresentadas nas figuras 20 a 24.

Na ausência do tumor, a fagocitose foi 2,30 vezes maior no grupo suplementado com o óleo de peixe (OP) quando comparada ao grupo controle (C). Ainda, quando o óleo de peixe foi administrado em associação com a capsaicina (OP+CAP), a fagocitose foi 2,96 vezes maior quando comparada ao grupo controle (C). O mesmo padrão fagocítico foi observado nos macrófagos obtidos dos animais portadores de tumor.

5.1.11 Fagocitose em macrófagos

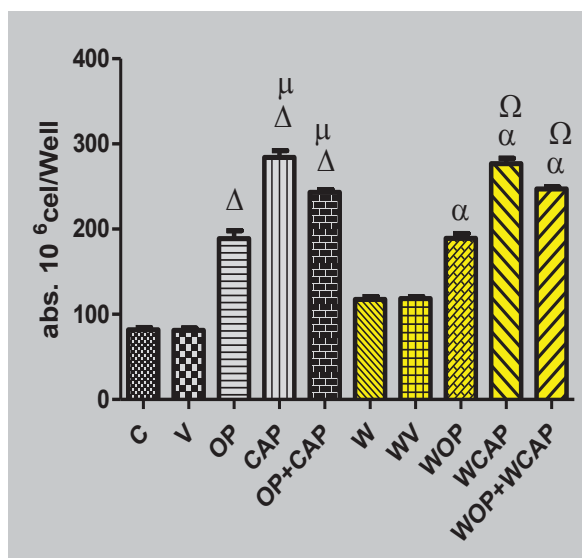


FIGURA 20: Atividade fagocítica em macrófagos, obtidos dos animais do grupo sem tumor alimentados com dieta padrão (c),), tratados com veículo (V), suplementados com óleo de peixe (OP), tratados com capsaicina (CAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (OP+ CAP), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (WOP), tratados com capsaicina (WCAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+ WCAP). Os dados representam a média \pm epm de 15 animais por grupo.

Δ $p < 0,05$ vs. C

μ $p < 0,05$ vs. OP

α $p < 0,05$ vs. W

Ω $p < 0,05$ vs. WOP

C	V	OP	CAP	OP+CAP
81,93 ±2,58	81,25 ±2,50	188,68 ±9,31	284,12 ±8,16	243,31 ±3,19

WC	WV	WOP	WCAP	WOP+WCAP
117,43 ±3,41	118,5 ±2,27	189,25 ±5,46	276,75 ±6,56	247 ±2,39

Os AGPI n-3 parecem alterar a composição dos “rafts” lipídicos, os quais possuem vários receptores para fagocitose. Além disso, o ômega 3 quando incorporado na membrana promove aumento da fluidez da mesma facilitando assim a formação de pseudópodos e conseqüentemente, a fagocitose (CALDER, *et al.*, 2007). Entretanto, o maior incremento da fagocitose foi observado no grupo tratado isoladamente com a capsaicina, tanto nos animais sem tumor, quanto nos animais com tumor. Nos animais sem tumor, a atividade fagocítica foi aproximadamente 3,46

vezes maior quando comparada à do grupo controle, enquanto que no grupo com tumor, 2,35 vezes maior que à do grupo W.

Nos grupos sem tumor, não houve diferença estatística em relação à retenção de vermelho neutro, padrão esse que não se repetiu nos grupos com tumor. No grupo suplementado com o óleo de peixe (WOP), a retenção lisossomal foi 1,85 vezes maior quando comparada ao grupo W, e ainda 2,29 vezes maior quando o óleo de peixe foi associado com a capsaicina (WOP+WCAP). Entretanto, a maior diferença foi observada no grupo em que a capsaicina foi administrada isoladamente (WCAP), a qual promoveu um incremento dessa atividade em 2,56 vezes quando comparada ao grupo W. Em estudo realizado por Shaikh e Edidin (2008), os AGPI 3 promoveram alteração da estrutura da membrana do complexo de Golgi e consequentemente aumentou a produção das vesículas de secreção desta organela e seu transporte para a membrana plasmática, além de possivelmente melhorar a atividade das enzimas lisossomais. Entretanto, os dados mediados pela capsaicina sugerem incremento mais pronunciado da atividade fagocítica e retenção lisossomal comparativamente ao grupo suplementado com óleo de peixe ($p < 0,05$) (Figuras 20 e 21).

5.1.12 Retenção de vermelho neutro em macrófagos

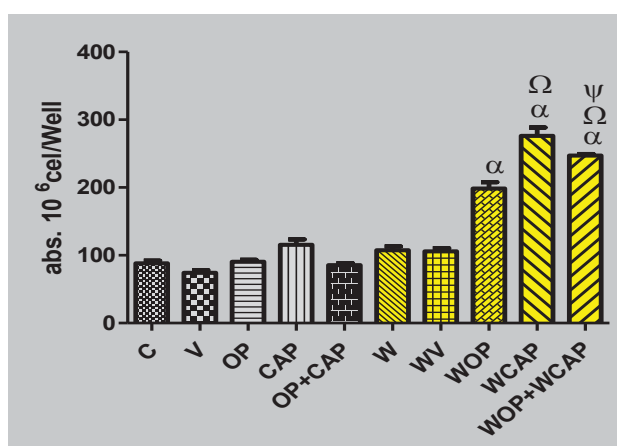


FIGURA 21: Retenção de vermelho neutro em macrófagos obtidos dos animais do grupo sem tumor alimentados com dieta padrão (c), tratados com veículo (V), suplementados com óleo de peixe (OP), tratados com capsaicina (CAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (OP+CAP), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (WOP), tratados com capsaicina (WCAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+ WCAP). Os dados representam a média \pm epm de 15 animais por grupo.

α $p < 0,05$ vs. W; Ω $p < 0,05$ vs. WOP; Ψ $p < 0,05$ vs. WCAP

C	V	OP	CAP	OP+CAP
88,2 ±3,90	74,06 ±4,21	90,46 ±3,11	115,4 ±8,01	85,6 ±2,96

WC	WV	WOP	WCAP	WOP+ WCAP
107,66 ±5,46	105,73 ±4,66	198,6 ±9,20	276,13 ±12,39	246,46 ±2,39

Os metabólitos reativos de oxigênio, tais como o superóxido, o radical hidroxil e o peróxido de hidrogênio são mediadores importantes de danos celulares, sendo que os mesmos podem ser gerados no citoplasma, na mitocôndria ou no núcleo das células (ANTUNES & BIANCHI, 2004). Assim sendo, foi avaliada a liberação de EROs pelos macrófagos peritoneais obtidos dos animais submetidos as suplementações e associações. A produção do ânion superóxido (figura 22) foi significativamente maior nos grupos suplementados com óleo de peixe e também quando o óleo de peixe foi administrado em associação com a capsaicina, tanto nos grupos sem tumor, quanto nos grupos com tumor. Entretanto, a capsaicina administrada isoladamente promoveu maior liberação de ânion superóxido, cerca de 3 vezes maior no grupo sem tumor, e cerca de 2,2 vezes maior no grupo com tumor, comparativamente aos seus respectivos controles (C, W).

5.1.13 Produção de ânion superóxido em macrófagos

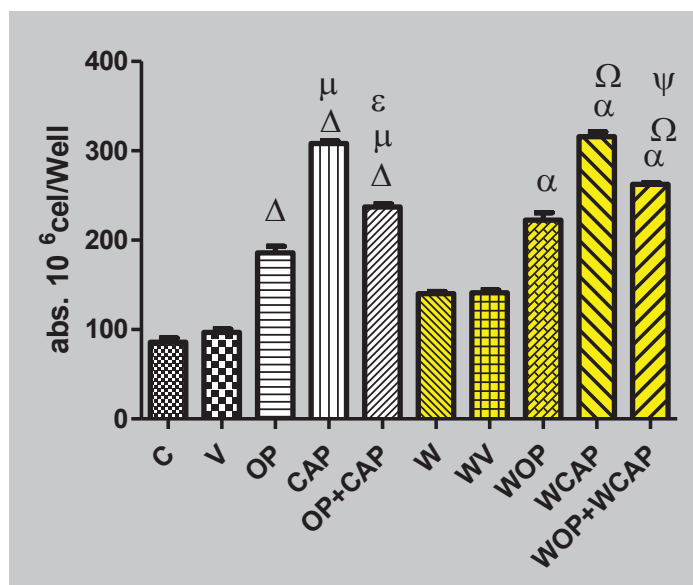


FIGURA 22: Produção de ânion superóxido em macrófagos obtidos dos animais do grupo sem tumor alimentados com dieta padrão (c), tratados com veículo (V), suplementados com óleo de peixe (OP), tratados com capsaicina (CAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (OP+CAP), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (WOP), tratados com capsaicina (WCAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+ WCAP). Os dados representam a média \pm epm de 15 animais por grupo.

Δ $p < 0,05$ vs. C;

μ $p < 0,05$ vs. OP;

ε $p < 0,05$ vs. CAP;

α $p < 0,05$ vs. W;

Ω $p < 0,05$ vs. WOP;

Ψ $p < 0,05$ vs. WCAP

C	V	OP	CAP	OP+CAP
85,93 \pm 4,65	96,93 \pm 3,57	185,66 \pm 7,43	308 \pm 3,04	237,33 \pm 3,047

W	WV	WOP	WCAP	WOP+WCAP
140,33 \pm 2,00	141,2 \pm 2,91	222,4 \pm 8,27	315,8 \pm 5,35	262,33 \pm 1,85

A produção de óxido nítrico na ausência de tumor e estímulo foi expressiva em todos os grupos (OP, CAP, OP+CAP) quando os mesmos foram comparados ao grupo controle. Óleo de peixe, capsaicina isolada ou ainda administrada em associação com o óleo de peixe, promoveram um incremento na expressão de ON em 2,5 vezes, 4,23 vezes e 3,7 vezes, respectivamente comparativamente ao grupo controle (C). Em todos os grupos, a presença do LPS foi capaz de promover incremento na produção do ON. Entretanto, a maior resposta ao LPS foi encontrada no grupo suplementado com óleo de peixe (WOP+LPS), em que a produção de ON foi 1,58 vezes maior comparativamente ao seu respectivo controle sem estímulo (WOP).

5.1.14 Produção de óxido nítrico em animais sem tumor

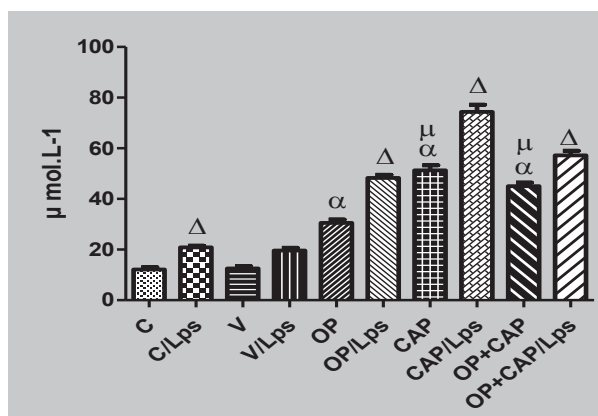


FIGURA 23: Produção de óxido nítrico pelos macrófagos obtidos dos animais do grupo sem tumor alimentados com dieta padrão (c), tratados com veículo (V), suplementados com óleo de peixe (OP), tratados com capsaicina (CAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (OP+CAP). Os dados representam a média \pm epm de 10 animais por grupo.

Δ p 0,05 vs. Ausência de LPS

α p < 0,05 vs. C;

μ p < 0,05 vs. OP

C	C/Lps	V	V/Lps	OP	OP/Lps	CAP	CAP/Lps	OP+CAP	OP+CAP/Lps
12,1± 0,93	20,9± 0,62	12,5± 0,93	19,6± 1,08	30,5± 1,36	48,3± 1,27	51,3± 1,97	74,4± 2,80	45± 1,43	57,2± 1,86

Quando os animais foram desafiados pela presença do tumor de Walker 256, (figura 24) entre os grupos sem estímulo, somente a capsaicina isoladamente foi capaz de mostrar incremento significativo na produção de óxido nítrico a qual foi 1,4 vezes maior em comparação ao grupo W. Em todos os grupos, a presença do LPS foi capaz de promover incremento na produção do ON, entretanto nos grupos com tumor, diferentemente dos grupos sem tumor, a melhor resposta ao LPS foi encontrada no grupo tratado com a capsaicina isolada (WCAP + LPS), a qual promoveu incremento da produção de ON cerca de 1,8 vezes mais comparativamente ao seu controle sem estímulo (WCAP).

5.1.15 Produção de óxido nítrico em animais com tumor

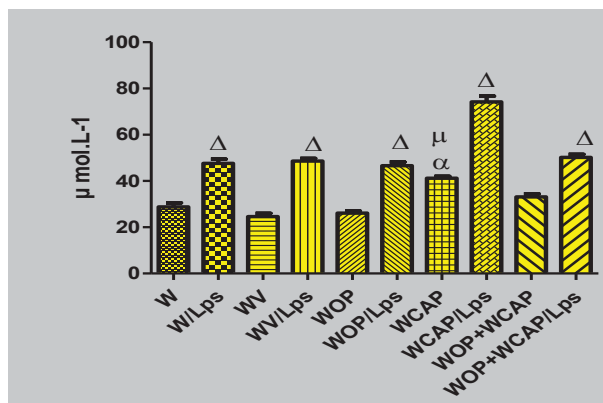


FIGURA 24: Produção de óxido nítrico pelos macrófagos obtidos dos animais do grupo com tumor alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (WOP), tratados com capsaicina (WCAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+WCAP). Os dados representam a média \pm epm de 10 animais por grupo.

Δ p 0,05 vs. Ausência de LPS

α p < 0,05 vs.W;

μ p < 0,05 vs. WOP

W	WC	WV	WV	WOP	WOP	WCAP	WCAP	WOP+CAP	WOP+WCAP
	/Lps		/Lps		/Lps		/Lps		/Lps
28,8± 1,73	47,6± 1,82	24,6± 1,40	48,6± 1,23	26,1± 0,93	46,6± 1,59	41,2± 0,80	74,2± 2,51	33,1± 1,37	50,2± 1,31

Uma possível explicação para o aumento de ON nos grupos suplementados com óleo de peixe é que as enzimas que resultam na síntese de ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico são reguladas por eicosanóides, citocinas e proteína quinase c. Os AGPI n-3 afetam a produção de eicosanóides e citocinas as quais interferem na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por

macrófagos (MILES, *et al.*, 1998; CALDER, 2002). Entretanto, os mecanismos pelos quais a capsaicina tenha levado a maior expressão do NO ainda não está claro.

Os dados da fagocitose, retenção lisossomal e produção de ânion superóxido de neutrófilos encontram-se apresentados nas figuras 25 a 27. O padrão fagocítico dos neutrófilos obtidos dos diferentes grupos, foi semelhante ao padrão verificado junto aos macrófagos. Nos grupos sem tumor, tanto óleo de peixe, quanto capsaicina e capsaicina associada com óleo de peixe foram capazes de promover incremento da atividade fagocítica, sendo que o óleo de peixe aumentou cerca de 2,1 vezes em relação ao grupo controle. Os grupos CAP e OP+CAP apresentaram resultados similares, com médias de $309,4 \pm 23,77$ e $297,3 \pm 3,50$, o que se mostrou cerca de 3,43 e 3,29 vezes maior ao grupo controle (C, $90,1 \pm 4,36$). Nos grupos com tumor, o maior aumento da atividade fagocítica foi verificado nos grupos WCAP e WOP+WCAP. Apesar do óleo de peixe (WOP) ter promovido um aumento da atividade fagocítica (cerca de 1,2 vs. W), a capsaicina isolada (WCAP) foi mais eficiente elevando em 2,41 vezes a fagocitose. Interessantemente, no grupo em que houve associação entre a capsaicina e o óleo de peixe (WCAP+WOP), a fagocitose foi 1,66 vezes maior em relação à do grupo W, e 1,31 vezes maior em relação à do grupo WOP. Os dados refletidos por esse último grupo não nos permite concluir se o óleo de peixe reduz a eficiência da capsaicina no incremento da atividade fagocítica, ou se a capsaicina é que amplia os efeitos do óleo de peixe em função de efeito aditivo.

5.1.16 Fagocitose em neutrófilos

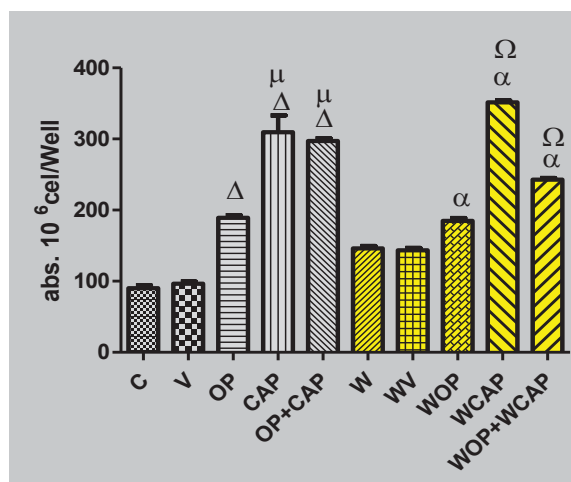


FIGURA 25: Atividade fagocítica em neutrófilos, obtidos dos animais do grupo sem tumor alimentados com dieta padrão (c), Δ , tratados com veículo (V), suplementados com óleo de peixe (OP), tratados com capsaicina (CAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (OP+ CAP), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (WOP), tratados com capsaicina (WCAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+ WCAP). Os dados representam a média \pm epm de 15 animais por grupo.

Δ $p < 0,05$ vs. C; μ $p < 0,05$ vs. OP; α $p < 0,05$ vs. W; Ω $p < 0,05$ vs. WOP

C	V	OP	CAP	OP+CAP
90,1 ±4,36	96,4 ±3,19	189 ±3,91	309,4 ±23,77	297,3 ±3,50

WC	WV	WOP	WCAP	WOP+WCAP
146,1 ±3,26	143,4 ±3,47	184,7 ±4,04	351,5 ±2,54	242,9 ±2,29

Na ausência de tumor, a retenção de vermelho neutro mostrou-se aumentada nos grupos OP, CAP e OP+CAP. Entretanto, na presença do tumor, somente WCAP e WOP+WCAP apresentaram retenção de vermelho neutro significativamente maior quando comparada à do grupo W ($p < 0,05$). Tanto nos grupos sem tumor, quanto nos grupos com tumor, a capsaicina isolada promoveu a maior retenção de vermelho neutro comparativamente aos demais grupos. Na ausência de tumor, a capsaicina promoveu incremento na retenção de vermelho neutro, cerca de 2,9 vezes maior em relação à do grupo controle (C), enquanto que diante da presença

do tumor, a retenção de vermelho neutro foi 1,7 vezes maior em relação à do grupo W.

5.1.17 Retenção de vermelho neutro em neutrófilos

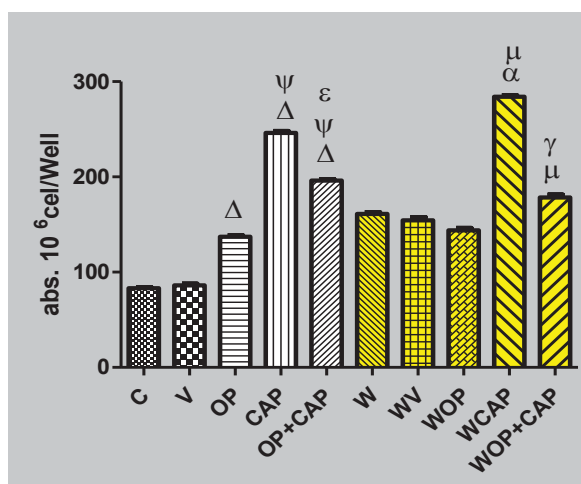


FIGURA 26: Retenção de vermelho neutro em neutrófilos obtidos dos animais do grupo sem tumor alimentados com dieta padrão (c), tratados com veículo (V), suplementados com óleo de peixe (OP), tratados com capsaicina (CAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (OP+CAP), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (WOP), tratados com capsaicina (WCAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+ WCAP). Os dados representam a média ± epm de 15 animais por grupo. Δ p< 0,05 vs. C; α p< 0,05 vs. W; Ψ p< 0,05 vs. OP; μ p< 0,05 vs. WOP; ε p< 0,05 vs. CAP; γ p< 0,05 vs. WCAP

C	V	OP	CAP	OP+CAP
83,13 ±0,96	86,2 ±1,58	137,13 ±1,53	246,13 ±1,97	196,0 ±1,49
W	WV	WOP	WCAP	WOP +WCAP
161,2 ±1,62	154,26 ±3,40	143,93 ±2,52	284 ±1,65	178,4 ±2,95

A produção de ânion superóxido em neutrófilos nos grupos sem tumor, foi mais pronunciada nos grupos OP, CAP e OP+CAP. Os mesmos, mostraram-se 2,18 vezes, 3,66 vezes e 3,21 vezes maior, respectivamente em relação ao grupo controle, respectivamente (p< 0,05). Os dados sugerem que a capsaicina aumenta a produção do ânion superóxido, efeito esse que também foi verificado nos grupos desafiados pela presença do câncer. Nesses, foi evidenciada maior produção do

ânion superóxido em relação aos seus respectivos controles sem tumor. WOP mostrou-se cerca de 1.95 vezes maior em relação ao grupo W, enquanto que WCAP, 2,65 vezes e WOP+WCAP, 2,41 vezes em relação à do grupo W.

5.1.18 Produção de ânion superóxido em neutrófilos

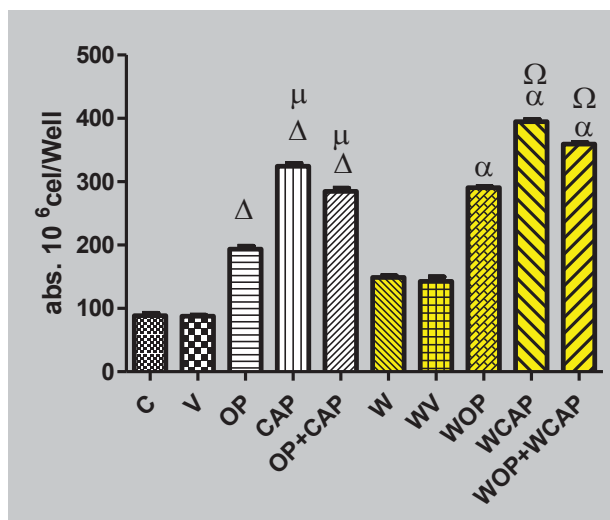


FIGURA 27: Produção de ânion superóxido pelos neutrófilos obtidos dos animais do grupo sem tumor alimentados com dieta padrão (c), tratados com veículo (V), suplementados com óleo de peixe (OP), tratados com capsaicina (CAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (OP+CAP), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (WOP), tratados com capsaicina (WCAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+WCAP). Os dados representam a média ± epm de 10 animais por grupo.

Δ p < 0,05 vs. C

μ p < 0,05 vs. OP

α p < 0,05 vs. W

Ω p < 0,05 vs. WOP

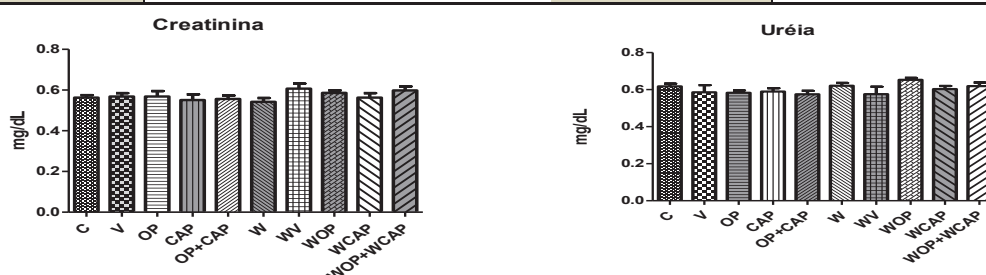
C	V	OP	CAP	OP+CAP
88,5±3,70	87,6±1,91	193,6±4,72	324,4±4,58	284,8±4,89
W	WV	WOP	WCAP	WOP+WCAP
148,8±2,47	142,8±7,00	290,6±1,83	394,7±3,29	359,3±2,37

5.1.19 Parâmetros bioquímicos de função renal e hepática

Os parâmetros bioquímicos de função renal e hepática encontram-se descritos nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5 : Concentrações plasmáticas de creatinina e uréia (mg/dL)

Não portadores de tumor			Portadores de tumor		
Grupos	Creatinina (mg/dL)	Uréia (mg/dL)	Grupos	Creatinina (mg/dL)	Uréia (mg/dL)
C	0,56±0,01	0,61±0,01	W	0,54±0,01	0,62±0,01
V	0,56±0,017	0,58±0,03	WV	0,60±0,02	0,57±0,03
OP	0,56±0,02	0,58±0,01	WOP	0,58±0,01	0,65±0,01
CAP	0,55±0,02	0,58±0,01	WCAP	0,56±0,02	0,60±0,01
OP+CAP	0,55±0,01	0,57±0,01	WOP+WCAP	0,59±0,01	0,61±0,01

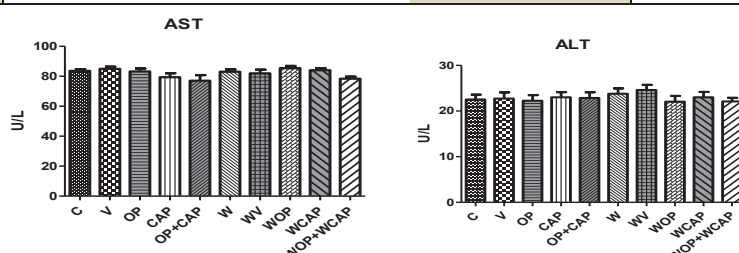


Concentrações plasmáticas de creatinina e uréia obtidos dos animais do grupo sem tumor alimentados com dieta padrão (c), tratados com veículo (V), suplementados com óleo de peixe (OP), tratados com capsaicina (CAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (OP+CAP), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (WOP), tratados com capsaicina (WCAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+ WCAP). Cada valor é a média \pm EPM, de 15 animais por grupo.

Os resultados sugerem que o óleo de peixe e os tratamentos com a capsaicina isolada ou combinada não alteraram significativamente os valores de creatinina e uréia ($p < 0,05$). Assim sendo, não promovem alterações na função renal do modelo experimental.

Tabela 6: Concentrações plasmáticas de AST(Aspartato aminotransferase) e ALT (Alanina aminotransferase)

Não portadores de tumor			Portadores de tumor		
Grupos	AST	ALT	Grupos	AST	ALT
C	83,67± 1,01	22,53±1,06	W	83,00± 1,58	23,80±1,16
V	84,93± 1,45	22,73±1,35	WV	81,93± 2,42	24,60±1,13
OP	83,20± 1,94	22,27±1,22	WOP	85,47± 1,37	22,07±1,24
CAP	79,33± 2,68	23,00±1,13	WCAP	84,00± 1,40	23,00±1,19
OP+CAP	77,07± 3,74	22,87±1,23	WOP+WCAP	78,40± 1,34	22,10±0,79



Concentrações plasmáticas de AST e ALT obtidos dos animais do grupo sem tumor alimentados com dieta padrão (C), tratados com veículo (V), suplementados com óleo de peixe (OP), tratados com capsaicina (CAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (OP+ CAP), e dos animais portadores de tumor alimentados com dieta padrão (W), tratados com veículo (WV), suplementados com óleo de peixe (WOP), tratados com capsaicina (WCAP), suplementados com óleo de peixe e tratados com capsaicina (WOP+ WCAP). Cada valor é a média ± EPM, de 15 animais por grupo.

Os resultados obtidos sugerem que a suplementação com óleo de peixe e capsaicina isolada ou combinada não alteraram significativamente as concentrações, das transaminases hepáticas ($p > 0,05$). Assim, não foram capazes de comprometer a função hepática no modelo experimental.

5.2 EXPERIMENTAÇÃO *IN VITRO*, LINHAGENS TUMORAIS

A investigação *in vitro* foi conduzida de modo a avaliar em outros modelos, os efeitos antitumorais atribuídos aos compostos estudados na experimentação *in vivo*. Para tanto, foram avaliados viabilidade celular por MTT, proliferação de células tumorais, necrose/apoptose. Foram analisadas quatro linhagens celulares, sendo elas: B16F10 (melanoma murino), HeLa (câncer de colo de útero), McCoy (fibroblastos de camundongo) e HepG2 (Hepatocarcinoma humano). A escolha das linhagens tumorais ocorreu de maneira aleatória. As células foram cultivadas em meio RPMI ou DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's médium*) alta glicose para a HepG2, em atmosfera contendo 5% de CO₂, a 37°C. As linhagens celulares foram incubadas durante 24 horas na presença de: a) BSA 2% (albumina sérica bovina diluída em meio), b) veículo (álcool etílico diluído em meio), c) 25 µL (1/8) de óleo de peixe complexado com BSA, d) 150µM de capsaicina diluída em veículo e depois em meio, e) 150µM de capsaicina em associação com 25 µL (1/8) de óleo de peixe.

A grande maioria dos estudos *in vitro*, utilizam ácidos graxos puros no meio de cultura, no sentido de definir qual AGPI apresenta efeito primário sobre o tumor. Contudo, o elevado custo financeiro, e ainda o comprometimento da solubilidade do ácido graxo em relação ao meio pode se associar a erros experimentais. No ambiente fisiológico, após a digestão e posterior absorção das gorduras, os ácidos graxos são transportados no plasma ligados à albumina (DEVLIN, 1998).

Assim, o óleo de peixe foi complexado à albumina para mimetizar o ambiente fisiológico. O preparo da capsaicina foi mais complexo, uma vez que essa substância apresenta potencial irritante significativo, exigindo dessa forma, maior atenção em relação à utilização de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs). Da mesma forma, sua solubilização em álcool etílico demandou agitação de aproximadamente 1 hora em agitador eletromagnético para que todo o produto em pó fosse solubilizado e depois diluído em meio. A definição da concentração de 150µM de capsaicina no meio, ocorreu mediante exposição prévia de células do tumor de Walker 256 e linhagens tumorais a nove concentrações distintas de capsaicina (Meio, 75 µM, 100 µM, 125 µM, 150 µM, 175 µM, 200 µM, 225 µM, 250

μM). O melhor nível de resposta anti tumoral foi obtido em concentrações entre 150 a 175 μM , o que nos conduziu a escolha de 150 μM nas demais investigações.

A proliferação das linhagens tumorais B16F10, HeLA, McCoy e HepG2 estão apresentadas nas figuras 28 a 31. Diante dos diferentes tratamentos, o melanoma murino B16F10 teve sua proliferação reduzida nos grupos OP, CAP e OP+CAP ($p < 0,05$ vs.C). A proliferação no grupo OP foi 67% menor quando comparada à do grupo controle, enquanto que o tratamento com a capsaicina promoveu redução na proliferação em 34%. Diante da associação entre a capsaicina e o óleo de peixe, a proliferação das células tumorais B16F10 foi reduzida em 66% em relação à do grupo controle ($p < 0,05$), padrão esse que se mostrou semelhante à do grupo tratado com óleo de peixe. A linhagem McCoy de fibroblastos de camundongos não teve sua proliferação significativamente alterada diante dos diferentes tratamentos, ao contrário da linhagem HeLA, cuja proliferação mostrou-se significativamente reduzida nos grupos OP, CAP e OP+CAP ($p < 0,05$). A proliferação das células tratadas com óleo de peixe foi 37% menor comparativamente à do controle, enquanto que no grupo de células tratadas com a capsaicina foi 48% menor. Entretanto, a proliferação de células tumorais no ambiente tratado com a capsaicina e com o óleo de peixe foi ainda mais reduzida, cerca de 60% menor em relação à do grupo controle ($p < 0,05$). Na linhagem HepG2, da mesma forma os tratamentos com óleo de peixe, capsaicina e capsaicina em associação com o óleo de peixe promoveram redução da capacidade proliferativa de maneira semelhante em aproximadamente 49% quando comparados ao do grupo controle.

5.2.1 Proliferação das células B16F10

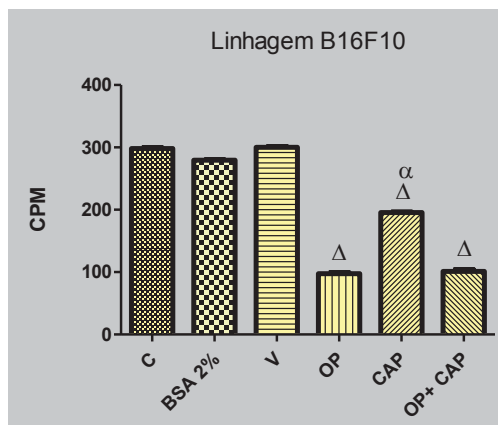


FIGURA 28: Proliferação das células B16F10 dos grupos: controle (C), BSA 2% (albumina sérica bovina), Veículo (V- Álcool Etilico), óleo de peixe (OP-razão de 1/8 no poço), Capsaicina (Cap-150 μ M), óleo de peixe + Capsaicina (OP+ Cap), após incubação de 24 horas. Cada ponto é a média \pm EPM, n=10

Δ p < 0,05 vs.C
 α p < 0,05 vs. OP

C	BSA 2%	V	OP	CAP	OP+CAP
298,1 \pm 2,00	279,6 \pm 1,30	300 \pm 2,29	97,6 \pm 2,30	195,5 \pm 1,55	101,2 \pm 3,29

5.2.2 Proliferação das células McCoy

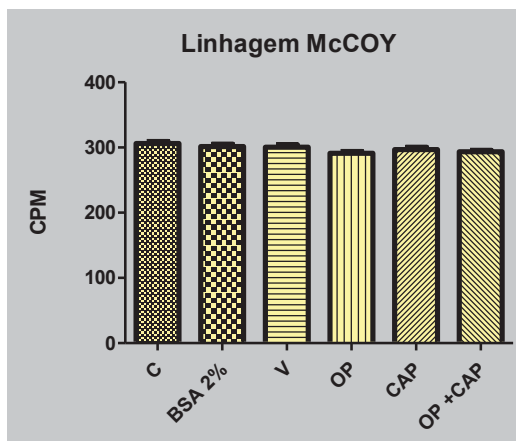


FIGURA 29: Proliferação das células McCoy dos grupos: controle (C), BSA 2% (albumina sérica bovina), Veículo (V- Álcool Etilico), óleo de peixe (OP-razão de 1/8 no poço), Capsaicina (Cap-150 μ M), óleo de peixe + Capsaicina (OP+ Cap), após incubação de 24 horas. Cada ponto é a média \pm EPM, n=10

C	BSA 2%	V	OP	CAP	OP+CAP
306 \pm 4,077	301,4 \pm 4,423	300,4 \pm 4,473	291,3 \pm 3,467	296,9 \pm 4,146	293,5 \pm 2,982

5.2.3 Proliferação de células HeLa

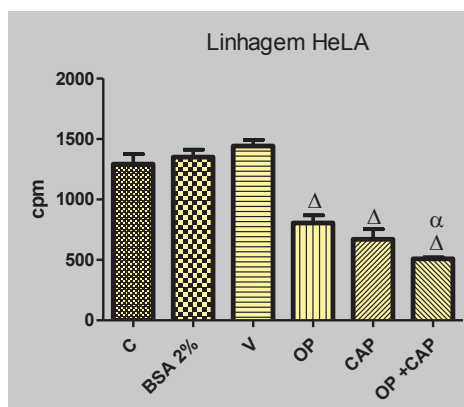


FIGURA 30: Proliferação das células HeLa dos grupos: controle (C), BSA 2% (albumina sérica bovina), Veículo (V- Álcool Etílico), óleo de peixe (OP-razão de 1/8 no poço), Capsaicina (Cap-150 μ M), óleo de peixe + Capsaicina (OP+ Cap), após incubação de 24 horas. Cada ponto é a média \pm EPM, n=10

Δ p< 0,05 vs.C

α p< 0,05 vs. OP

C	BSA 2%	V	OP	CAP	OP+CAP
1292,11 ±83,74	1351,44 ±60,31	1442,11 ±51,46	806,11 ±63,76	670,77 ±82,90	509,11 ±11,00

5.2.4 Proliferação de células HepG2

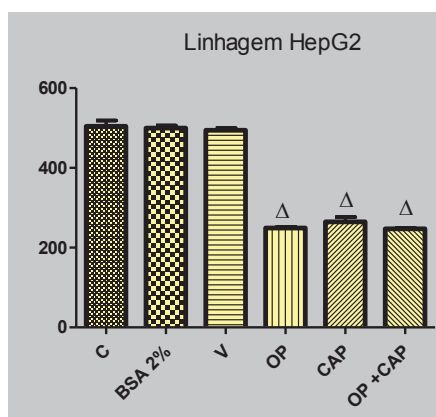


FIGURA 31: Proliferação das células HepG2 dos grupos: controle (C), BSA 2% (albumina sérica bovina), Veículo (V- Álcool Etílico), óleo de peixe (OP-razão de 1/8 no poço), Capsaicina (Cap-150 μ M), óleo de peixe + Capsaicina (OP+ Cap), após incubação de 24 horas. Cada ponto é a média \pm EPM, n=10

Δ p< 0,05 vs.C

C	BSA 2%	V	OP	CAP	OP+CAP
504± 14,72	499,9± 6,18	494,4± 5,53	249,4± 2,66	264,7± 12,18	247,3± 2,51

Para análise da viabilidade das linhagens tumorais expostas aos tratamentos já mencionados, optou-se pelo teste do sal de tetrazolium-MTT. O MTT é utilizado em ensaio de proliferação celular que quantifica a capacidade das células viáveis de reduzirem o sal amarelo de tetrazolium a cristais púrpuros de formazan com o auxílio de uma enzima mitocondrial denominada de succinato desidrogenase. Assim, células vivas são detectadas e o sinal gerado depende da diminuição de ativação das células sendo que os resultados são lidos em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983). Nos modelos experimentais estudados (figuras 32 a 35), não houve modificação na viabilidade da linhagem McCoy (Fibroblastos de Camundongos), sugerindo dessa forma que os tratamentos praticados não apresentaram efeito tóxico sobre células não tumorais, ainda que tais células sejam provenientes de camundongos. A não toxicidade nos tratamentos propostos em associação a possíveis efeitos anti carcinogênicos favorece o desenvolvimento de novas terapias menos prejudiciais ao paciente, uma vez que as drogas administradas atualmente e aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*) apresentam elevada toxicidade.

Diferentemente da linhagem McCoy, nas linhagens B16F10, HeLa e HepG2, os tratamentos promoveram mudanças significativas ($p < 0,05$) da viabilidade celular em comparação aos grupos controle.

Na linhagem B16F10, o óleo de peixe reduziu a viabilidade das células tumorais em aproximadamente 28% quando comparada à do grupo controle. O mesmo efeito foi verificado junto ao grupo OP + CAP, entretanto o tratamento isolado com a capsaicina não foi capaz de mediar a redução da viabilidade de células B16F10. Tanto na linhagem HeLa quanto HepG2, a viabilidade das células tratadas com OP, Cap e Cap+OP foi significativamente menor ($p < 0,05$) quando comparada ao grupo controle (C), mostrando-se em média 44% e 40% mais reduzida.

5.2.5 Viabilidade de células B16F10

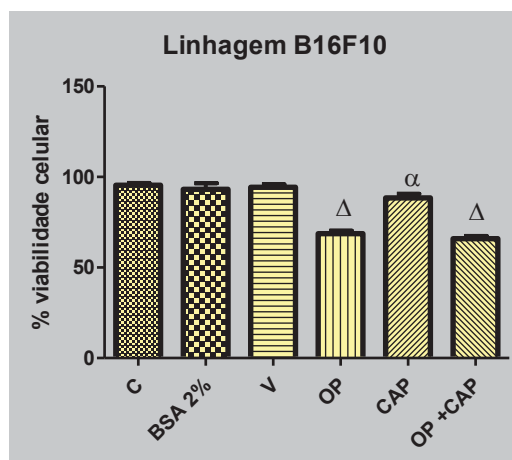


FIGURA 32: Viabilidade de células B16F10 dos grupos: controle (C), BSA 2% (albumina sérica bovina), Veículo (V- Álcool Etílico), óleo de peixe (OP-razão de 1/8 no poço), Capsaicina (Cap- 150 μ M), óleo de peixe + Capsaicina (OP+ Cap), após incubação de 24 horas. Cada ponto é a média \pm EPM, n=10

Δ p < 0,05 vs.C

α p < 0,05 vs OP

C	BSA 2%	V	OP	CAP	OP+CAP
95,44 \pm 1,21	93,22 \pm 3,35	94,33 \pm 1,61	68,66 \pm 1,62	88,44 \pm 2,28	65,88 \pm 1,60

5.2.6 Viabilidade de células HeLA

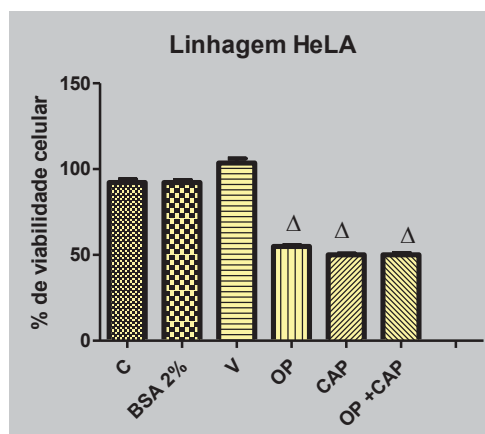


FIGURA 33: Viabilidade de células HeLA dos grupos: controle (C), BSA 2% (albumina sérica bovina), Veículo (V- Álcool Etílico), óleo de peixe (OP-razão de 1/8 no poço), Capsaicina (Cap- 150 μ M), óleo de peixe + Capsaicina (OP+ Cap), após incubação de 24 horas. Cada ponto é a média \pm EPM, n=10

Δ p < 0,05 vs.C

C	BSA 2%	V	OP	Cap	OP+Cap
92,2 \pm 1,86	92,2 \pm 1,51	103,6 \pm 2,57	54,9 \pm 0,78	50 \pm 0,80	50,1 \pm 1,12

5.2.7 Viabilidade de células McCoy

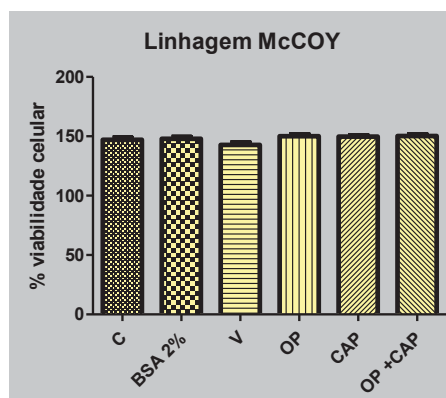


FIGURA 34: Viabilidade de células McCoy dos grupos: controle (C), BSA 2% (albumina sérica bovina), Veículo (V- Álcool Etílico), óleo de peixe (OP-razão de 1/8 no poço), Capsaicina (Cap-150 μ M), óleo de peixe + Capsaicina (OP+ Cap), após incubação de 24 horas. Cada ponto é a média \pm EPM, n=10

C	BSA 2%	V	OP	CAP	OP+CAP
147 \pm 2,21	147,9 \pm 2,08	142,8 \pm 2,48	150 \pm 2,01	149,7 \pm 1,55	150,3 \pm 1,78

5.2.8 Viabilidade das células HepG2

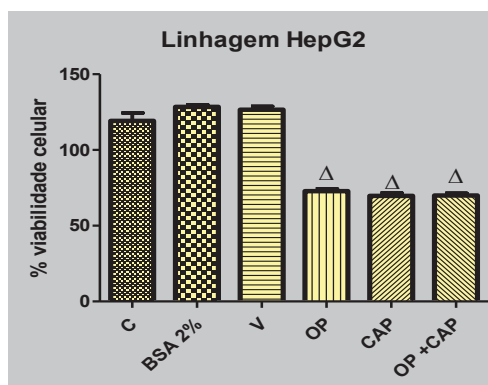


FIGURA 35: Viabilidade de células HepG2 dos grupos: controle (C), BSA 2% (albumina sérica bovina), Veículo (V- Álcool Etílico), óleo de peixe (OP-razão de 1/8 no poço), Capsaicina (Cap-150 μ M), óleo de peixe + Capsaicina (OP+ Cap), após incubação de 24 horas. Cada ponto é a média \pm EPM, n=10

$\Delta p < 0,05$ vs.C

C	BSA 2%	V	OP	CAP	OP+CAP
119,2 \pm 5,23	128,4 \pm 1,39	126,6 \pm 2,25	72,8 \pm 1,55	69,7 \pm 1,88	69,9 \pm 1,56

A análise dos dados de viabilidade e proliferação conduziu a avaliação dos parâmetros de morte celular. Optou-se pela citometria de fluxo, que permite a análise de vários parâmetros simultaneamente, com o auxílio de um aparelho de

detecção óptico-eletrônico. Os dados obtidos (tabelas 7 a 10) denotam que o óleo de peixe apresenta-se mais eficiente como facilitador do mecanismo apoptótico, comparativamente aos grupos em que a capsaicina se mostrou presente (CAP e CAP+OP). Nas células B16F10, a apoptose verificada nos grupos celulares tratados com o óleo de peixe foi 3,4 vezes maior quando comparada à do grupo controle ($p<0,05$), dado esse que se mostra semelhante ao padrão apoptótico verificado no grupo OP+CAP (aproximadamente 3,43 vezes maior que o controle, $p<0,05$). Da mesma forma, na linhagem HeLA os grupos tratados com óleo de peixe, seja ele isolado ou em associação com a capsaicina, obtiveram maior percentual apoptótico, cerca de 2,7 e 2,6 vezes maior que à do grupo controle ($p<0,05$). Nessa mesma linhagem celular, interessantemente a capsaicina foi capaz de elevar em 2,97 vezes a apoptose, comparativamente ao grupo C. Na linhagem HepG2, a capsaicina isolada não foi capaz de promover alteração do percentual de células em apoptose, diferentemente do óleo de peixe, que mais uma vez elevou a taxa de apoptose no grupo OP ($24,10\pm0,80^{\Delta\%}$) e no grupo OP+CAP ($23,00\pm0,57^{\Delta\Psi\%}$) em comparação ao grupo C ($10,70\pm1,08\%$).

Nesse sentido, os dados obtidos mostraram-se compatíveis com aqueles discutidos na literatura acerca do óleo de peixe. O aumento dos ácidos AGPI n-3 na dieta eleva a taxa de apoptose de células tumorais. O mesmo efeito foi verificado em células tumorais de próstata de camundongos suplementados com dieta contendo proporção de 1:1 entre AGPI n-3 e AGPI n-6 durante 8 semanas (KOBAYASHI, *et al.*, 2006). A apoptose de células tumorais de cólon Caco e HT-29 cultivadas *in vitro* com óleo de peixe emulsionado em etanol 95%, foi também significativamente maior ($p<0,05$) quando comparado ao grupo controle (LLOR, *et al.*, 2003). Potente ação pró-apoptótica de células tumorais de cólon HT-29 foi observada após incubação com DHA (CHEN & ISTFAN, 2000). Neste estudo, o incremento da atividade apoptótica tanto nos grupos suplementados isoladamente com óleo de peixe (OP), quanto nos grupos suplementados com capsaicina e óleo de peixe (CAP +OP), parece estar relacionado às propriedades do óleo de peixe já discutidas.

5.2.9 Avaliação da apoptose/necrose das linhagens celulares

Tabela 7: Percentual (%) de células apoptóticas, necróticas e viáveis determinado por citometria de fluxo, linhagem B16F10, dos grupos: controle (C), BSA 2% (albumina sérica bovina), Veículo (V- Álcool Etílico), óleo de peixe (OP-razão de 1/8 no poço), Capsaicina (CAP- 150 μ M), óleo de peixe + Capsaicina (OP+ CAP), após incubação de 24 horas. Cada ponto é a média \pm EPM, n=10. Δ p< 0,05 vs.C

Grupos	CÉLULAS B16F10		
	Células apoptóticas (%)	Células necróticas(%)	Células viáveis (%)
C	11,70 \pm 0,49	4,52 \pm 0,49	83,3 \pm 1,5
BSA 2%	11,80 \pm 0,57	4,40 \pm 0,26	83.8 \pm 2,2
V	11,80 \pm 0,55	4,66 \pm 0,42	82.8 \pm 2,4
OP	39,80 \pm 0,91 ^{Δ}	4,92 \pm 0,58	55,2 \pm 1,8 ^{Δ}
CAP	11,50 \pm 0,65 ^{α}	4,26 \pm 0,29	84.3 \pm 1,4 ^{α}
OP+CAP	40,20 \pm 0,97 ^{$\Delta\Psi$}	4,29 \pm 0,32	56.5 \pm 1,2 ^{$\Delta\Psi$}

Δ p<0,05 v.W, α p<0,05 v. WOP, Ψ p<0,05 v. WCAP

Tabela 8: Percentual (%) de células apoptóticas, necróticas e viáveis determinado por citometria de fluxo, linhagem MacCoy, dos grupos: controle (C), BSA 2% (albumina sérica bovina), Veículo (V- Álcool Etílico), óleo de peixe (OP-razão de 1/8 no poço), Capsaicina (Cap- 150 μ M), óleo de peixe + Capsaicina (OP+ Cap), após incubação de 24 horas. Cada ponto é a média \pm EPM, n=10. Δ p< 0,05 vs.C

Grupos	CÉLULAS MacCoy		
	Células apoptóticas (%)	Células necróticas(%)	Células viáveis (%)
C	46,70 \pm 2,36	6,03 \pm 0,50	47.3 \pm 1,5
BSA 2%	40,50 \pm 2,90	5,86 \pm 0,53	53.4 \pm 2,3
V	42,60 \pm 2,15	5,96 \pm 0,41	52.2 \pm 1,6
OP	44,60 \pm 1,70	6,68 \pm 0,59	51.6 \pm 1.2
CAP	44,10 \pm 1,50	6,77 \pm 0,57	49.6 \pm 1.6
OP+CAP	43,50 \pm 2,52	6,05 \pm 0,58	50.1 \pm 1.8

Tabela 9: Percentual (%) de células apoptóticas, necróticas e viáveis determinado por citometria de fluxo, linhagem HeLA, dos grupos: controle (C), BSA 2% (albumina sérica bovina), Veículo (V- Álcool Etílico), óleo de peixe (OP-razão de 1/8 no poço), Capsaicina (CAP- 150 μ M), óleo de peixe + Capsaicina (OP+ CAP), após incubação de 24 horas. Cada ponto é a média \pm EPM, n=10. Δ p< 0,05 vs.C

Grupos	CÉLULAS HeLA		
	Células apoptóticas (%)	Células necróticas(%)	Células viáveis (%)
C	10,11 \pm 0,58	4,14 \pm 0,48	86.12 \pm 1,2
BSA 2%	9,986 \pm 0,64	3,91 \pm 0,41	87.24 \pm 1,8
V	9,560 \pm 0,69	3,55 \pm 0,21	87.18 \pm 1,6
OP	27,30 \pm 1,00 ^{Δ}	3,55 \pm 0,44	60.15 \pm 0,4 ^{Δ}
CAP	30,07 \pm 0,44 ^{Δ}	3,99 \pm 0,28	66.16 \pm 1,1 ^{Δ}
OP+CAP	26,95 \pm 0,79 ^{Δ}	3,67 \pm 0,26	70.14 \pm 1,4 ^{Δ}

Δ p<0,05 v.W

Tabela 10: Percentual (%) de células apoptóticas, necróticas e viáveis determinado por citometria de fluxo, linhagem HepG2, dos grupos: controle (C), BSA 2% (albumina sérica bovina), Veículo (V- Álcool Etílico), óleo de peixe (OP-razão de 1/8 no poço), Capsaicina (CAP- 150 μ M), óleo de peixe + Capsaicina (OP+ CAP), após incubação de 24 horas. Cada ponto é a média \pm EPM, n=10. Δ p< 0,05 vs.C

Grupos	CÉLULAS HepG2		
	Células apoptóticas (%)	Células necróticas(%)	Células viáveis (%)
C	10,70 \pm 1,08	1,87 \pm 0,11	87,12 \pm 2,1
BSA 2%	10,10 \pm 0,60	1,98 \pm 0,01	88,13 \pm 1,1
V	10,50 \pm 0,50	1,94 \pm 0,03	88,15 \pm 1,1
OP	24,10 \pm 0,80 $^{\Delta}$	1,94 \pm 0,03	74,12 \pm 1,2 $^{\Delta}$
CAP	11,30 \pm 0,77 $^{\alpha}$	1,82 \pm 0,01	87,15 \pm 1,1 $^{\alpha}$
OP+CAP	23,00 \pm 0,57 $^{\Delta\Psi}$	1,83 \pm 0,03	75,16 \pm 0,8 $^{\Delta\Psi}$

Δ p<0,05 v.W, α p<0,05 v. WOP, Ψ p<0,05 v. WCAP

Diante dos resultados *in vivo* e *in vitro*, os AGPI n-3 isolados ou combinados com a capsaicina representam uma terapia capaz de retardar a evolução da doença. Entretanto, dentro de uma perspectiva futura, novos estudos devem ser conduzidos com outras linhagens celulares e outros modelos *in vivo*. Da mesma forma, as vias pelas quais a capsaicina promove redução da massa tumoral devem ser investigadas considerando-se estudos que questionam seus efeitos anti-tumorais.

CONCLUSÕES

O óleo de peixe isolado ou combinado a capsaicina parece ser uma alternativa coadjuvante como terapia anti-tumoral, uma vez que os resultados indicaram no modelo *in vivo* redução considerável da massa tumoral, efeito pró-apoptose e menor proliferação de células do tumor de Walker 256, menor depleção fisiológica e elevação da massa corpórea dos animais. Nos estudos *in vitro*, os mesmos efeitos apoptóticos e anti-proliferativos induzidos pelos tratamentos foram evidenciados nas linhagens HeLA e HepG2.

Em adição, a própria ausência de alterações nas funções hepáticas e renais em associação com os benefícios já evidenciados, sugerem que o óleo de peixe isolado ou combinado a capsaicina não promoveu efeito tóxico sobre os ratos da linhagem Wistar, o que se mostra promissor e possivelmente transponível para humanos.

Concomitantemente, os tratamentos propostos promoveram aumento dos linfócitos TCD8 provenientes do linfonodo mesentérico, incremento da atividade fagocítica, aumento na produção de ânion superóxido em macrófagos e neutrófilos obtidos dos animais portadores de tumor, demonstrando assim efeitos em diferentes vias de sinalização. Cabe ressaltar que os efeitos induzidos pela capsaicina denotam a necessidade de estudos em outros modelos, para que seja elucidado se a mesma exerce seus efeitos através do sistema imunológico, diretamente sobre o tumor ou mediante efeito associado.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008
- ADAMS, B.D. Antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial properties of garlic and onions. **Nutrition & food Science**, v.37, n.3, p. 178-183, 2007.
- AGGARWAL, B.B.; KUNNUMAKKARA, A.B.; HARIKUMAR, K. B.; THARAKAN, S.T.; SUNG, B.; ANAND, P. Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. **Planta Médica**, v.74, p.1560-1563, 2008.
- AGOSTINO, D.; CLIFFTON, E.E. The Growth and Transplantability of the Carcinosarcoma of Walker 256 in the Ascitic Form. **Experientia**, v.24, n.2, p. 166-168, 1968.
- AIKAWA, J. et al. Glucose metabolism by lymphocytes, macrophages, and tumor cells from Walker 256 tumor-bearing rats supplemented with fish oil for one generation. **Cell.Biochem.Funct.**, v. 26, n. 8, p. 874-80, 2008.
- AMANTINI, C.; MOSCA, M.; LUCCIARINI, R.; PERFUMI, M.; MORRONE, S.; PICCOLI, M.; SANTONIM, G. Distinct thymocyte subsets Express the vanilloid receptor VR1 that mediates capsaicin-induced apoptotic cell death. **Cell Death Differ.**, 2004, 11, 1342-1356.
- ANDERSON, B. M.; MA, D. W. L. Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal? **Lipids in Health and Disease**, v.8, n.33, p.1-20, 2009.
- ANDRADE JÚNIOR, D.R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v.31, n.1, p.60-68, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpneu/v31n1/23457.pdf>>. Acesso em: 03 de fev. 2010. doi: 10.1590/S1806-37132005000100011.
- ANJO, D.F. **Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular** .*Journal Vascular Brasileiro*. Santa Catarina, v.3, n.2, p.145-154, 2004.
- ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M. L. P. Antioxidantes da dieta como inibidores da nefrotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina. **Revista de Nutrição**, 17(1):89-96, jan./mar., 2004.
- ARGILÉS, J.M.; ALVAREZ, B.; LOPES-SORIANO, F.J. The metabolism basis of cancer cachexia. **Med. Res. Rev.** 17(5):477-98, 1997.
- ATHANASIOU, A.; SMITH, P.A.; VAKILPOUR, S.; KUMARAN, N.M.; TURNER, A.E.; BAGIOKOU, D.; LAYFIELD, R.; RAY, D.E.; WESTWELL, A.D.; ALEXANDER, S.P.H.; DENDALL, D.A.; LOBO, D.N.; WATSON, S.A.; LOPHATANON, A.; MUIR, K.A.; GUO, D.; BATES, T.E. Vanilloid receptor agonists and antagonists are mitochondrial inhibitors: how vanilloids cause non-vanilloid receptor mediated cell death. **Biochem Biophys.** 354, 50-55, 2007.

BACKONJA, M.M. High-concentration capsaicin for the treatment of post-herpetic neuralgia and other types of peripheral neuropathic pain. **European Journal of Pain Supplements**, v.4, p.170-174, 2010.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet** 357:539–545, 2001.

BARBER, M. D. Cancer Cachexia and its treatment with fish-oil-enriched nutritional supplementation. **Nutrition**, v. 17, p. 751-755, 2001.

BELFIELD, A., GOLDBERG, D. M. Inhibition of the nucleotidase effect on alkaline phosphatase by glycerophosphate. **Nature**, 291:73-5, 1968.

BELO, S. R. B.; LAGHER, F.; SOUZA, W.; NUNES, J.; NALIWAICO, K.; SASSAKI, G.; BONATTO, S.; OLIVEIRA, H.H.P.; BRITO, G.A.P.; LIMA, C.; KRYCZYK, M.; SOUZA, C.F.; STEFFANI, J.A.; NUNES, E.A.; FERNANDES, L.C. Walker-256 tumor growth is inhibited by the independent or associative chronic ingestion of shark liver and fish oil: a response linked by the increment of peritoneal macrophages nitrite production in Wistar rats. **Nutrition Research**, v. 30, p. 770–776, 2010.

BERQUIN, I. M.; EDWARDS, I. J.; CHEN, Y. Q. Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. **Cancer Lett.**, v. 269, n. 2, p. 363-377, 2008.

BHUTANI, M.; PATHAK, A.K.; NAIR, A.S.; KUNNUMAKKARA, A.B.; GUHA, S.; SETHI, G.; AGGARWAL, B.B. Capsaicin is a novel blocker of constitutive and interleukin inducible stat3 activation. **Clinical Cancer Research**, v.13, p. 3024-3031, 2007.

BLAAUW, I.D.; DEUTZ, N.E.P.; MEYENFELDT, M.F.V. Metabolic changes in cancer cachexia- first of two parts. **Clinical Nutrition**, v. 16, p. 169-176, 1997.

BODANSKY, O. Acid phosphatase. **Adv. Clin. Chem.**, 15:4-136, 1972.

BODE, A.M.; DONG, Z. The Two Faces of Capsaicin. **Cancer Res.** 71(8):2809-2014, 2011.

BONGAERTS, G.P.A.; HALTEREN, H. K. V.; VERHAGEN, C. A. M. Cancer cachexia demonstrates the energetic impact of gluconeogenesis in human metabolism. **Medical Hypotheses**, v. 67, p. 1213–1222, 2006.

BONTEMPO, M. **Pimenta e seus benefícios**. São Paulo: Alaúde, 2007.

BORGHETTI, G. **Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a expressão gênica de cox-2 em ratos portadores de tumor de walker 256**. 59 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA. **Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 2012**. Rio de Janeiro; 2013.

BRUNELLE, J.K.; LETAI, A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. **Journal of cell science**, v. 122, p.437-441, 2009.

CALDER, P. C.; KEW, S. The immune system: a target for functional foods. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 165-176, 2002.

CALDER, P. C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, p. 327–335, 2007.

CALDER, P.C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.74, n.4. p.1-43, 2012.

CARAWAY, W.T. A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. **Am. J. Clin. Pathol.**, 32:97-9, 1959.

CARREIRO, D.M. **Entendendo a importância do processo alimentar**. São Paulo: Limitada, 2006.

CASTELLONE, M.D.; TERAMOTO, H.; WILLIAMS, B.O.; DRUEY, K.M.; GUTKIND, J.S. Prostaglandin E2 promotes colon cancer cell growth through a Gs-axin-beta-catenin signaling axis. **Science**, v.310, p. 1504-10, 2005.

CATERINA, M.J.; SCUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.;LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature.**, 816-824,1997.

CATERINA, M.J.; & JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annu Rev Neurosci.**, 487-517, 2001.

CAYGILL, C.P.; CHARLETT, A.; HILL, M.J.Fat, fish, fish oil and cancer. **Br J Cancer**, v. 74, p. 159-64,1996.

CHAABANE, W.; USER, S.D.; EL-GAZZAH,M.; JAKSIK, R. Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer. **Archivumimmunologiaeettherapiaexperimentalis**, v. 61, p. 43–58, 2013.

CHEN, J.; STAVRO, P.M.; THOMPSON, L.U. Dietary flaxseed enhances the inhibitory effect of tamoxifen on the growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) in nude mice. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 15, p. 7703–7711, 2004.

COMHAIR, S.A.A.; ERZURUM, S.C. Antioxidant responsesto oxidant-mediated lung diseases. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology,v.283,p.L246-L255, 2002.Disponível em: <<http://ajplung.physiology.org/cgi/reprint/283/2/L246>>. Acesso em:03 de fev. 2010. doi: 10.1152/ajplung.00491.2001.

CORSETTO, P.A. et al. Effects of n-3 PUFAs on breast cancer cells through their incorporation in plasma membrane. **Lipids in health and disease**, v.10:73, 2011.

CORTRIGHT, D.N.; CRANDALL, M.; SANCHEZ, J.F.; ZOU, T.; KRAUSE, J.E.; WHITE, G. The tissue distribution and functional characterization of human VR1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 5, p.1183-1189, 2004.

COSTA, M.T.; FABENI, R.C.; APTEKMANN, K.P.; MACHADO, R.R. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. **Ciências Rurais**, v. 33, p. 967-974, 2003.

COUTINHO, M.M. **Efeito do treinamento moderado sobre o metabolismo de macrófagos de ratos envelhecidos**. Tese de Doutorado, USP, São Paulo, 2004.

CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. Manole, São Paulo, 2002.

CZIFRA, G.; VARGA, A.; NEYESTE, K.; MARINCSEK, R.; TOTH, B.I.; KOVACS, L.; BIRO, T. Increased expressions of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloide-1 in human prostate carcinoma. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v.135, p. 507-514, 2009.

DAMASCENO, D.C.; VOLPATO, G.T. **Radicais livres, estresse oxidativo e diabetes**. Diabetes Clínica, v.5, n.5, p.355-361, 2002.

DANIEL, D. et.al. Immune enhancement of skin carcinogenesis by CD4+ T cells. **J Exp Med.**, v. 197, p. 1017-1028, 2003.

DELVES, P.J.; ROITT, I.M. The immune system. First of two parts. **N Engl J Med**, v. 6, p. 37-49, 2000.

DEVLIN, T.M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas** 4ed. Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 1998.

DODESINI, A.R.; BENEDINI, S.; TERRUZI, I.; SERENI, L.P.; LUZI, L. Protein, glucose and lipid metabolism in the cancer cachexia: A preliminary report. **Acta Oncologica**, v. 46, p. 118-120, 2007.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 343-350, 2003.

DUNN, T.B. Morphology and histogenesis of mammary tumors. A. **A.S. Publication**, v. 22, p. 13-38, 1945

EARLE, W.R. A study of the Walker rat mammary carcinoma 2567 in vivo and in vitro. **Am. J. Cancer**, v.24, p. 566-612, 1935.

ENGEL; JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD in alkaline Hydrazina buffers, improved conditions of L-Glutamate, L-Lactate, and other metabolites. **Annals of Biochemistry**, v.88, p.475-484, 1978.

ERDEM, N.Z.; KULAÇOĞLU, I.H.; TEMEL, M.A.; YASTI, A.Ç.; KAMA, N.A.; BOZKURT, N. Perioperative oral supplement with immunonutrients in gastrointestinal cancer patients. *Turkish Journal of Medical Sciences*, v.31, p. 79-86, 2001.

ESTELLER, M.; HERMAN, J.G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *Journal of Pathology*, v. 196, p. 1-7, 2002.

ESTEVEZ, E.A.; MONTEIRO, J.B.R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. *Revista de Nutrição*, v.14, p. 43-52, 2001.

FAHY, E.; SUBRAMANIAM, S.; BROWN, H.A.; GLASS, C.K.; MERRILL, A.H.; MURPHY, R.C.; RAETZ, C.R.H.; RUSSELL, D.W.; SEYAMA, Y.; SHAW, W.; SHIMIZU, T.; SPENER, F.; MEER, G.; VANNIEUWENHZE, M.S.; WHITE, S.H.; WITZTUM, J.L.; DENNIS, E.A. A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, v. 46, p. 839-861, 2005.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and infection*, v. 5, n. 14, p. 1317-1327, 2003.

FAVALORO, B.; ALLOCATI, N.; GRAZIANO, V.; ILIO, C.D.; LAURENZI, V. Role of apoptosis in disease. *Aging*, v.4, n.5, p.330-349, 2012.

FERGUSON, L. R.; PHILPOTT, M.; KARUNASINGHE, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, v.198, p.147-159, 2004.

FERNANDES, L.C. **Alterações metabólicas causadas pelo tumor de Walker 256 no músculo esquelético, linfócitos e macrófagos de ratos.** Tese de Doutorado, USP, São Paulo, 1995.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.43, p.61-68, 1997. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ramb/v43n1/2075.pdf>>. Acesso em: 03 de fev. 2010. doi: 10.1590/ S0104-42301997000100014

FOLADOR, A.; HIRABARA, S.M.; BONATTO, S.J.R.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R.K.; CURI, R.; FERNANDES, L.C. Effect of fish oil supplementation for 2 generations on changes in macrophage function induced by Walker 256 cancer cachexia in rats. *Int J Cancer* 2006, 120:344-350. OpenURL

FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique.** Hoboken NJ, John Wiley & Sons, 2005.

FUKUI, M.; KANG, K.S.; OKADA, K.; ZHU, B.T. EPA, an Omega-3 Fatty Acid, Induces Apoptosis in Human Pancreatic Cancer Cells: Role of ROS Accumulation, Caspase-8 Activation, and Autophagy Induction. *Journal of cellular biochemistry*, v. 114, p. 192-203, 2013.

GALLI, C.; CALDER, P. C. Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: a critical review. *Ann. Nutr. Metab.*, v. 55, p. 123-139, 2009.

GALLUZZI, L.; KEPPAND, O.; KROEMER, G. Caspase-3 and prostaglandins 97 signal for tumor regrowth in cancer therapy. **Oncogene**, v.31, p. 2805-2808,2012.

GANJI, V.; KAFAL, M.R. Capsaicinoids in vegetative organs of *Capsicum annum L.* in relation to fruiting. **American Journal of Clinical Nutrition**.v.6, p.1500-1507, 2004.

GANNOT, G.; BUCHNER, A.; KEISARI,Y.Interaction between the immune system and tongue squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline N-oxide in mice. **Oral Oncol.**, v.40, p.287-297, 2004.

GARÓFOLO, A.; LOPEZ,F.A.; PETRILLI,A.S. High prevalence of malnutrition among patients with solid non-hematological tumors as found by using skinfold and circumference measurements. **Medical Journal**, v.123, p.277-281,2005.

GARÓFOLO, A. Diretrizes para terapia nutricional em crianças com câncer em situação crítica. **Revista de Nutrição**, v.18, p. 513-527, 2005.

GASPARETTI, A.L. **Envolvimento dos neurônios aferentes primários sensíveis a capsaicina nas funções cardíacas de ratos**.2000.90p.Tese (Mestrado)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

GENDRON, L.; LUCIDO, A.L.; MENNICKEN, F.; O'DONNELL, D.; VINCENT, J.P.; STROH, T. et al. Morphine and painrelated stimuli enhance cell surface availability of somatic delta-opioid receptors in rat dorsal root ganglia. **J Neurosci**, v.26, p. 953-62, 2006.

GIL,A. Polyunsaturated fatty acids and inflammation diseases. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v. 56, p.388-396, 2002.

GRANCI, V; DUPERTUIS, V.Y; PICHARD, C. Angiogenesis as a potential target of pharmaconutrients in cancer therapy. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v.13, p.417-422, 2010.

GRIMBLE, R.F. Nutritional therapy for cancer cachexia. **Gut**,v. 52, p. 1391-1392, 2003.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, p. 335-343, 2007

GUAITANI, A. et al. Two lines of Walker carcinoma 256: their peculiarities and different interactions with the host. **Tumor**, v.1, p.1-9, 1983.

GUERRA, E. J. I.; **Anales Medicina Interna**, v. 18, p. 326, 2001.

GUIMARAES, F. et al., Tumor Growth Characteristics of the Walker 256 AR Tumor, a Regressive Variant of the Rat Walker 256 A tumor. **Brazilian archives of biology and technology**, v.53, n. 5, p. 1101-1108, 2010.

HARDMAN, W.E. (n-3) Fatty Acids and Cancer Therapy. **J Nutr.**, v.134, p. 3427S-3430S, 2004.

HERING, J.; GARREAN, S.; DEKOJ, T.R.; RAZZAK, A.; SAIED, A.; TREVINO, J.; BABCOCK, T.A.; ESPAT, N.J. Inhibition of proliferation by omega-3 fatty acids in chemoresistent pancreatic cells. **Annals of Surgical Oncology**, v. 14, n. 12, p. 3620-3628, 2007

HOCH-LIGETI, C. Production of liver tumours by dietary means; effect of feeding chilies to rats. **Acta Uniolnt Contra Cancrum**, v. 7, p. 606-11, 1951.

HULL, M.A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.25, p.547-554, 2011.

HUMANN, M.B.; CUNNINGHAM, R.S. Importance of nutritional screening in treatment of cancer-related weight loss. **Lancet Oncology**, v. 6, p. 334-343, 2005.

HUNTER, K.W. Host genetics and tumour metastasis. **British Journal of Cancer**, v. 90, p.752-755, 2004.

IAGHER, F. **Efeito da suplementação conjunta crônica com óleo de fígado de tubarão e óleo de peixe sobre crescimento tumoral, caquexia e atividade linfocitária de ratos Wistar portadores de tumor de Walker 256**. 139 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Setor Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

INOUE, N.; MATSUNAGA, Y.; SATOH, H.; TAKAHASHI, M. Enhanced energy expenditure and fat oxidation in humans with high BMI scores by the ingestion of novel and non-pungent capsaicin analogues (capsinoids). **Bioscience, Biochemistry and Biochemistry**, v.71, p.380-389, 2007.

INUI, A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: are neuropeptides the key? **Cancer Research**, v. 59, p.4493-4501, 1999.

INUI, A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. **CA A Cancer Journal for Clinicians**, v. 52:, p. 72-91, 2002.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. CAPRA, J. D. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

KARMEN, S.A. Note on the spectrophotometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human blood serum. **J. Clin. Invest.**, v. 34, p.131-3, 1955.

KAUR, I.; SIMONS, E.R.; CASTRO, V.A.; OTT, C.M.; PIERSON, D.L. Changes in neutrophil functions in astronauts. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 18, p. 443-450, 2004.

KELLY, P. N.; STRASSER, A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. **Cell Death and Differentiation**, v.18, p.1414-1424, 2011.

KIM, J.S.; KWON, H.Y.; CHOI, W.H.; JEON, C.Y.; KIM, J.I.; KIM, J.; LEE, J.Y.; KIM, Y.S.; PARK, J.B. Phagocytosis of serum and IgG-opsonized zymosan particles induces apoptosis through superoxide but not nitric oxide in macrophage J774A.1. **Experimental and Molecular Medicine**, V. 35, p. 211-221, 2003.

KIM, M.Y.; TRUDEL, L.J.; WOGAN, G.N. Apoptosis induced by capsaicin and resveratrol in colon carcinoma cells requires nitric oxide production and caspase activation. **Anticancer Research**, v.29, p. 3733-3739, 2009.

KNOWLES, B.B.; HOWE, C.C.; ADEN, D.P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. **Science**, v.209, p. 497-499, 1980.

KOBAYASHI, N.; BARNARD, R.J.; HENNING, S.M.; ELASHOFF, D.; REDDY, S.T.; COHEN, P.; LEUNG, P.; HONG-GONZALEZ, J.; FREEDLAND, S.J.; SAID, J.; GUI, D.; SEERAM, N.P.; POPOVICIU, L.M.; BAGGA, D.; HEBER, D.; GLASPY, J.A.; ARONSON, W.J. Effect of altering dietary ω -6/ ω -3 fatty acid ratios on prostate cancer membrane composition, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 15, p. 4662-4670, 2006.

KUDA, T.; IWAI, A.; YANO, T. Nutrition and sciences. **Food and Chemical Toxicology**, v.5, p.1695-1700, 2004.

LARSSON, S. C. *et al.* Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 79, p. 935– 945, 2004.

LEE, B.M.; PARK, K.K. Beneficial and adverse effects of chemopreventive agents. **Mutat Res.**, v.523-524, p. 265-78, 2003.

LEIGHTON, B.; COOPER, G.J.S. Pancreatic amylin and calcitonin gene-related peptide cause resistance to insulin in skeletal muscle in vitro. **Nature**, v. 3, p.632-635, 1989.

LIKELY, G.D.; SANFORD, K.K.; EARLE, W.R. Further studies on de proliferation *in vitro* of single isolated tissue cells. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 13, p. 177-184, 1952.

LLOR, X.; PONS, E.; ROCA, A.; ALVAREZ, M.; MANE, J.; FERNANDEZ-BANARES, F.; GASSULL, M.A. The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid colorectal neoplastic processes. **Clinical Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 71-79, 2003.

LÓPEZ-CARRILLO, L.; HERNÁNDEZ AVILLA, M.; DUBROW, R. Chili pepper consumption and gastric cancer in Mexico: a case-control study. **Am J Epidemiol.**, v.139, p. 263-71, 1994.

LUNN, J. Nutrição e envelhecimento saudável. **Nutrição em Pauta**. São Paulo, v. 85, p. 5-9, 2007.

MACDONALD, N.; EASSON, A.M.; MAZURAK, V.C.; DUNN, G.P.; BARACOS, V.E. Understanding and managing cancer cachexia. **J Am Coll Surg.**, v. 197, p.143-161, 2003.

MACMAHON, B.; GODSON, C. Lipoxins: endogenous regulators of inflammation. **American Journal of Physiology**, v.286, p. 189-201, 2004.

MAITY, R.; SHARMA, J.; JANA, N.R. Capsaicin induces apoptosis through ubiquitin–proteasome system dysfunction. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 109, p 933–942, 2010.

MALAGARIE-CAZENAVE, S.; OLEA-HERRERO, N.; VARA, D.; DÍAZ-LAVIADA, I. Capsaicin, a component of red peppers, induces expression of androgen receptor via PI3K and MAPK pathways in prostate LNCaP cells. **FEBS Lett.**, v.583, p.141-7, 2009.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKILL, F. *Cancer related inflammation*. **Nature**, v. 454, p. 436-444, 2008.

MARTIGNONI, M.E.; KUNZE, P.; FRIESS, H. Cancer cachexia. **Molecular Cancer.**, v. 2, p.36-39, 2003.

MATIN, S.J.; REUTELINGSPERGER, C.P.; MCGAHON, A.J.; RADER, J.A.; VANSCHIE, R.C.; LAFACE, D.M.; GREEN, D.R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by over expression of Bcl-2 and Abl. **J Exp Med**, v. 182, p. 1545-1556, 1995.

MAYNE, P.; DAY, D.; ANDREW, P. Workbook of clinical chemistry: case presentation and data interpretation. **New York : Oxford University Press**, 1994.

MAZZOTTA, P.; JENEY, C. M. Anorexia-Cachexia syndrome: a systematic review of the role of dietary polyunsaturated fatty acids in the management of symptoms, survival, and quality of life. **J. Pain Symptom**, v. 37, n. 6, p. 1069-1077, 2008.

McCOY, T. A.; NEUMAN, R.E. The cultivation of Walker carcinoma 256 *in vitro* from cell suspensions. **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 16, p. 1221-1229, 1956.

McCUSKER, M. M.; GRANT-KELS, J. M. Healing fats of the skin: the structural and immunologic roles of the ω -6 and ω -3 fatty acids. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p. 440–451, 2010.

MCENTEE, M.F.; WHELAN, J. Dietary polyunsaturated fatty acids and colorectal neoplasia. **Biomed Pharmacother**, v. 56, p. 380-387, 2002.

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature**, v. 407, p. 796-801, 2000.

MEZEY, E.; TOTH, Z.E.; CORTRIGHT, D.N.; ARZUBI, M.K.; KRAUSE, J.E.; ELDE, R.; GUO, A.; BLUMBERG, P.M.; SZALLASI, A. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, p. 3655-3660, 2000.

MENENDEZ, J.A.; LUPU, R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 763-777, 2007.

MIDER, G.B.; TESLUK, H.; MORTON, J.J. Effects of Walker carcinoma 256 on food intake, body weight and nitrogen metabolism of growing rats. **Acta Uniol Internat. Cancr. Louvain**, v. 6, p. 409-420, 1948.

MILES, E. A. et al. Limited effect of eicosapentaenoic acid on T-lymphocyte and natural killer cell numbers and functions in healthy young males. **Nutrition**, v. 22, p. 512-519, 2006.

MILLS, P. et al. Effects of ozone and airway inflammation on glutathione status and iron homeostasis in the lungs of horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.57, p.1359-1363, 1996.

MODLY, C.E. Drug Metabolism and Disposition. **The Biological Fate of Chemicals**, v.14, p.413-416, 1986.

MOLENDI-COSTE, O.; LEGRY, V.; LECLERCQ, I.A. Why and How Meet n-3 PUFA Dietary Recommendations? **Gastroenterology Research and Practice**, 2011.

MOON, D.; KANG, C.; KANG, S.; CHOI, Y.; HYUN, J.; CHANG, W.; KANG, H.; KOH, Y.; MAENG, Y.; KIM, Y.; G. Capsaicin sensitizes TRAIL-induced apoptosis through Sp1-mediated DR5 UP-REGULATION: Involvement of Ca²⁺ influx. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.259, n.1, p.87-95, 2012.

MORI, A.; LEHAMANN, S.; O'KELLY, J.; KUMAGAI, T.; DESMOND, J.C.; PERVAN, M.; MCBRIDE, W.H.; KIZAKI, M.; KOEFFLER, H.P. Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgenindependent, p53 mutant prostate cancer cells. **Cancer Res.**, v.66, p. 3222-3229, 2006.

MORLEY, J. E.; THOMAS, D. R.; WILSON, M.-M. G. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 83, n. 4, p.735-743, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUND, R. C. et al. Decreased tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats chronically supplemented with fish oil involves COX-2 and PGE2 reduction associated with apoptosis and increased peroxidation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 76, p. 113-120, 2007.

NAGABHUSHAN, M.; BHIDE, S.V. Mutagenicity of chili extract and capsaicin in short-term tests. **Environ Mutagen**, v. 7, p. 881-8, 1985.

NETO, N.L. **Dicionário Gastronômico: pimentas com suas receitas**. São Paulo: Boccato, 2004.

NETTLETON, J.A. **Omega -3 fatty acids and health**. Chapman & Hall. New York, 1995.

NIEDERGANG, F; CHAVRIER, P. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagosome. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, p. 422–428, 2004.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n.11, p. 1287-1312, 2001.

NUEZ, F. **El cultivo de pimientos, chiles y ajies**. Madri: Ediciones Mundi-Prensa, 1995.

NUNES, E. A. **Efeitos do β -hidroxi- β -metilbutirato (hmb) sobre produção de citocinas e vias de sinalização de células imunitárias**. 80 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews Cancer**, v.4, p. 592-603, 2004.

OLAH, Z.; SZABO, T.; KARAI, L.; HOUGH, C.; FIELDS, R.D.; CAUDLE, R.M.; BLUMBERG, P.M.; IADAROLA, M.J. Ligand-induced dynamic membrane changes and cell deletion conferred by vanilloid receptor. **J. Biol. Chem.**, v.276, p. 11021-11030, 2001.

OLIVEIRA, H.H.P. **Cultivo de células ascíticas do tumor de Walker 256 na presença de óleo de peixe-BSA complexado: efeitos sobre proliferação e morte celular e seus mecanismos de ação**. Dissertação de Mestrado, 2006.

OLSZEWER, E. **Radicais livres em medicina**. BYK, São Paulo, 1995.

OTTO, L. **Aspectos genéticos do câncer**. Popular, São Paulo, 2002.

PATTERSON, E. *et al.* Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids. **Journal of Nutrition and Metabolism**, p.1-16, 2011.

PEQUITO, D. C. T. **Suplementação com óleo de peixe em ratos diabéticos. avaliação de parâmetros bioquímicos sanguíneos e da resposta imunológica**. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PEREIRA, J. **Capsicum annuum. The elements of materia medica and therapeutics**. Blanchard and Lea, Philadelphia, p. 505–7, 1854.

PERRY, L.; DICKAU, R.; ZARRILLO, S.; HOLST, I.; PEARSALL, D.M.; PIPERNO, D.R., *et al.* Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers. ***Capsicum spp. L. Science***, v.315, p. 986-8, 2007.

PERUCKA, I.; MATERSKA, M. Antioxidant vitamin contents of *Capsicum annum* fruit extracts as affected by processing and varietal factors. ***ActaSci.Pol., Technol. Aliment.***, v.6, n.4, p.67-73, 2007.

PINTO JR, J. A. *et al.* Fish oil supplementation in F1 generation associated with naproxen, clenbuterol, and insulin administration reduce tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing Rats. ***Journal of Nutritional Biochemistry***, v.15, p. 358–365, 2004.

PIZATO, N. ; BONATTO, S.J.R.; YAMAZAKI, R.K.; AIKAWA, J.; NOGATA, C.; MUND, R.C.; NUNES, E.A.; MARESSA, P.; NALIWAICO, K.; CURI, R. CALDER, P.; FERNANDES, L.C. Ratio of n-6 to n-3 fatty acids in the diet affects tumor growth and cachexia in walker 256 tumor-bearing rats. ***Nutrition and Cancer***, v. 53, n. 2, p. 194–201, 2005.

POSEN, S., DOHERTY, E. Serum alkaline phosphatase in clinical medicine. ***Adv. Clin. Chem.***, v. 2, p.163-245, 1981.

RAPOPORT, A.M. The therapeutic future in headache. ***Neurological Sciences***, v.33, p. 119-125, 2012.

REBUCCI, M.; MICHIELS, C. Molecular aspects of cancer cell resistance to chemotherapy. ***Biochemical pharmacology***, v. 85, p.1219-1226, 2013.

REED, J.C. Mechanisms of apoptosis. ***American Journal of Pathology***, v. 157, n. 5, p. 1415-1430, 2000.

REIFSCHNEIDER, F.J.B. *Capsicum*- pimentas e pimentões no Brasil. ***Brasília Embrapa Comunicação para transferência de Tecnologia/ Embrapa Hortaliças***, 2000.

REILLY, C.A.; YOST, G.S. Metabolism of capsaicinoids by P450 enzymes: a review of recent findings on reaction mechanisms, bio-activation, and detoxification processes. ***Drug Metab Rev.***, v. 38, p. 685-706, 2006.

REUBOLD, T. F.; ESCHENBURG, S. A molecular view on signal transduction by the apoptosome. ***Cellular Signalling***, v.24, p.1420-1425, 2012.

RHEE, Y.; PAIK, M.J.; KIM, K.R.; KO, Y.G.; KANG, E.S.; CHA, B.S.; LEE, H.C.; LIM, S.K. Plasma free fatty acid level patterns according to cardiovascular risk status in postmenopausal women. ***Clinica Chimica Acta***, v. 392, p. 11-16, 2008.

RIEDIGER, N.D.; OTHMAN, R.A.; SUH, M. A Systemic Review of the Roles of n-3 Fatty Acids in Health and Disease. ***Journal of the american dietetic association***, v.109, p. 668-679, 2009.

RITTIG, M.G.; WILSKE, B.; KRAUSE, A. Phagocytosis of microorganisms by means overshooting pseudopods: where do we stand? ***Microbes and Infection***, v. 1, p. 727–735, 1999.

RIVADENEIRA, D.E.; EVOY, D.; FAHEY, T.J.; LIEMBERMAN, M.D.; DALY, J.M. Nutritional Support of the Cancer Patient. ***Cancer Journal for Clinicians***, v. 48, p.69-80, 1998.

ROSALKI, S. B. Gamma-glutamyltranspeptidase. ***Adv. Clin. Chem.***, v.17, p. 53-107, 1975.

ROSE, D. P.; CONOLLY, J.M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. ***Pharmacology and Therapeutics***, v. 83, p. 217-244, 1999.

SABEL, M.S. et al. CTLA-4 blockade augments human T lymphocyte-mediated suppression of lung tumor xenografts in SCID mice. ***Cancer Immunol Immunother***, v.54, p.944-952, 2005.

SARHILL, N.; MAHMOUD, F.; WALSH, D.; NELSON, K.A.; KOMURCU, S.; DAVIS, M. Evaluation of nutrition status in advanced metastatic cancer. ***Support Care Cancer***, v. 11, p.652-659, 2003.

SAUER, L.A.; BLASK, D.E.; DAUCHY, R.T. Dietary factors and growth and metabolism in experimental tumors. ***Journal of Nutritional Biochemistry***, v.18, p.637–649, 2007.

SCHIESSEL, D. L. **Ácido graxo α -linolênico causa o mesmo efeito que seus derivados de cadeia longa em ratos portadores de tumor de Walker 256? Investigação antitumoral e imunitária.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SCHÖNFELD, P.; WOJTCZAK, L. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. ***Free Radic Biol Med***, v. 45, p. 231–241, 2008.

SERINI, A. et al. Dietary polyunsaturated fatty acids as inducers of apoptosis: implications for cancer. ***Apoptosis***, v.14; p.135-152, 2009.

SERRA, I.; YAMAMOTO, M.; CALVO, A.; CAVADA, G.; BÁEZ, S.; ENDOH, K. Association of chili pepper consumption, low socioeconomic status and longstanding gallstones with gallbladder cancer in a Chilean population. ***Int J Cancer***, v. 102, p.407-11, 2002.

SHARMA, P. et al. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle invasive urothelial carcinoma. ***PNAS***, v. 104, n. 10, p. 3967–3972, 2007.

SIDDIQUI, R.A.; HARVEY, K.A.; ZALOGA, G.P. Modulation of Lipid Rafts by omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Cancer: Implications for Use of Lipids During Nutritional Support. ***Nutr Clin Pract.***, v. 22, p. 74-88, 2007.

SIMOPOULOS, A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **American Journal of Clinic Nutrition**, v. 70, p.560S-569S, 1999.

SIMOPOULOS, A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2002.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. **Experimental Biology and Medicine**, v.233, n.6, p.674-688, 2008.

SOEIRO, M.N.C.; SILVA-FILHO, F.C.; MEIRELLES, M.N.L. The nature of anionic sites and endocytic pathway in heart muscle cells. **J. Submicrosc. Cytol Pathol.**, v.26, n. 1, p.121-130, 1994.

STAROWICZ, K.; NIGAM, S.; Di MARZO, V. Biochemistry And Pharmacology of Endovanilloids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 59, p. 450-7, 2007.

STOLL, B. A. n-3 Fatty acids and lipid peroxidation in breast cancer inhibition. **British Journal of Nutrition**, v. 87, p. 193–198, 2002.

STUEHR, P.J.; MARLETTA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia Coli lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Sci.**, v. 82, p.7738-7742, 1985.

STURK, A., SANDERS, G. T. B. Macro enzymes: prevalence, composition, detection and clinical relevance. **J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v. 28, p.65-81, 1990.

SUCHNER, U.; SENFTLEBEN, U. Immune modulation by polyunsaturated fatty acids during nutritional therapy: Interactions with synthesis and effects of eicosanoids. **Infusionstherapie und Transfusionsmedizin, Basel**, v. 21, n. 3, p. 167-182, 1994.

SURESH, D.; SRINIVASAN, K. Tissue distribution & elimination of capsaicin, piperine & curcumin following oral intake in rats. **Indian J Med Res.**, v. 131, p.682-91, 2010.

SURH, Y.J.; LEE, E.; LEE, J.M. The Capsaicin Study. **Mutation Research**, v.41, p.259-267, 2002.

SZOLCSANYI, J.; SANDOR, Z. Multimeric TRPV1 nociceptor: a target for analgesics. **Trends in Pharmacological Sciences**, p. 1-10, 2012.

SZWEDA, P.A., FRIGUET, B., SZWEDA, L.I. Proteolysis, free radicals, and aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v.33, p.29-36, 2002.

TANG, Y.; PIETRO, L.; FENG, Y.; WANG, X.: Increased TNF- α and PGI₂, but not NO release from macrophages in 18 – month-old rats. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 114, p. 79-88, 2000.

TAPIERO, H.; NGUYEN, B.; COUVREUR, P.; TEW, K.D. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. ***Biomedicine & Pharmacotherapy***, v. 56, p.215-222, 2002.

THIES, F. *et al.* Dietary supplementation with g-linolenic acid or fish oil decreases T lymphocyte proliferation in healthy older humans. ***J. Nutr.***, v. 131, p. 1918–1927, 2001.

THRESH, J.C. Isolation of capsaicin. ***Pharmaceut. J. Transactions***, v.6, p. 941–7, 1876.

TISDALE, M.J. Wasting in cancer. ***The Journal of Nutrition.***, v.129, p.243S-246S, 1999.

TISDALE, M.J. Metabolic abnormalities in cachexia and anorexia. ***Nutrition***, v. 16, p.1013-1014, 2000.

TISDALE, M.J. Molecular Pathways Leading to Cancer Cachexia. ***Physiology***, v. 20, p. 340-348, 2005.

TOGNI, V. *et al.* Cancer cachexia and tumor growth reduction in walker 256 tumor-bearing rats supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids for one generation. ***Nutrition and Cancer***, v. 46, n. 1, p. 52–58, 2003.

TOTH, B.; GANNETT, P. Carcinogenicity of lifelong administration of capsaicin of hot pepper in mice. ***In Vivo***, v.6, p.59-63, 1992.

TSOU, M.F.; LU, H.F.; CHEN, S.C.; WU, L.T.; CHEN, Y.S.; KUO, H.M.; LIN, S.S.; CHUNG, J.G. Involvement of Bax, Bcl-2, Ca²⁺ and Caspase-3 in capsaicin induced apoptosis of human leukemia HL-60 cells. ***Anticancer research***, v.26, p. 1965-1971, 2006.

TURK, H.F.; CHAPKIN, R.S. Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids. ***Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids***, v. 88, p. 43-47, 2013.

ULUKAYA, E.; ACILAN, C.; YILMAZ, Y. Apoptosis: why and how does it occur in biology? ***Cell biochemistry and function***, v. 29, p. 468-480, 2011.

VALDÉS-RAMOS, R.; BENÍTEZ-ARCINIEGA, A. D. Nutrition and immunity in cancer. ***British Journal of Nutrition***, v. 98, p. S127–S132, 2007.

VASCONCELOS, S. O. R.; GOULART, O. O. F.; OOURA, J. B. F.; OANFREDINI, V.; BENFATO, O. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. ***Química Nova***, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VALKO M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.44-84,2007.

VANDER STELT, M.; DI MARZO, V. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. **European Journal of Biochemistry**, v.10, p.1827-1834, 2004.

VERMEULEN, L.; SPRICK, M.R.; KEMPER, K.; STASSI, G.; MEDEMA, J.P. Cancer stem cells-old concepts, new insights. **Cell Death and Differentiation**,v.15, p. 947–958, 2008.

VESCOVI, A.L.; GALLI, R.; REYNOLDS, B.A. Brain tumor stem cell. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 425-436, 2008.

VISSER, K.E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature Reviews Cancer**, v.6, p. 24-37, 2006.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. The multistep nature of cancer. **Trends in Genetics**, v. 9, p.138-141, 1993.

VOLEK, J.S.; FERNANDEZ, M.L.; FEINMAN, R.D.; PHINNEY, S.D. Dietary carbohydrate restriction induces a unique metabolic state positively affecting atherogenic dyslipidemia, fatty acid partitioning, and metabolic syndrome. **Progress in Lipids Research**, v. 47, p.307-318, 2008.

WAITZBERG, D.L.; CAIAFFA, W.T.; CORREIA, M.I.T.D. Hospital malnutrition: the Brazilian national survey (IBRANUTRI): a study of 4000 patients. **Nutrition**, v.17, p. 573-580, 2001.

WALLACE, F. A.; MILES, E. A.; CALDER, P. C. Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 89, p. 679–689, 2003.

WANG, D.; DUBOIS, R.N. Pro-inflammatory prostaglandins and progression of colorectal cancer. **Cancer Letters**, v. 267, p.197-203, 2008.

WEIDEMANN, A.; JOHNSON, R.S. Biology of HIF. **Cell Death and Differentiation**,v.15, p.621-627, 2008.

WELCH, H.; MAURAN, C.; MARIDONNEAU-PARINI, I. Nonreceptor Protein-Tyrosine Kinases in Neutrophil Activation. **METHODS: A Companion to Methods in Enzymology**, v.9, p.607–618,1996.

WHITE, J.P.M.; CIBELLI, M.; REI FIDALGO, A.; PAULE, C.C.; Noormohamed,F.; Urban, L.; Maze, M.; Nagy, I. Role of transient receptor potential and acid-sensing ion channels in peripheral inflammatory pain. **Anesthesiology**, v.112, p.729-74,2010.

WILLIAMS, C.D. et al. A high ratio of dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids is associated with increased risk of prostate cancer. **Nutrition research**, v.31, p.1-8, 2011.

WILSON, R.L. Optimizing nutrition for patients with cancer. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v.4, p.23-28, 2000.

WU, C.C.; LIN, J.P.; YANG, J.S.; CHOU, S.T.; CHEN, S.C.; LIN, Y.T.; LIN, H.L.; CHUNG, J.G. Capsaicin induced cell cycle arrest and apoptosis in human esophagus epidemoid carcinoma CE 81T/VGH cells through the elevation of intracellular reactive oxygen species and Ca^{2+} productions and caspase-3 activation. **Mutation Research**, v. 601, p. 71-81, 2006.

YAQOOB, P.; CALDER, P. C. Fatty acids and immune function: new insights into mechanisms. **British Journal of Nutrition**, v. 98, p. S41–S45, 2007.

YANG, T. et al. N-3 PUFAs have antiproliferative and apoptotic effects on human colorectal cancer stem-like cells in vitro. **Journal Nutrition Biochemistry**, p.1-10, 2012.

YOUNES, R.N.; NOGUCHI, Y. Pathophysiology of cancer cachexia. **Rev. Hosp. Clin.**, v.55, p.181-193, 2000.

ZHANG, G.; LIN, R.L.; WIGGERS, M.E.; LEE, L.Y. Sensitizing effects of chronic exposure and acute inhalation of ovalbumin aerosol on pulmonary C-fibers in rats. **J Appl Physiol**, p.105:128, 2008.

ZHAO, W.; LIU, H.; XU, S.; ENTSCHLADEN, F.; NIGGEMANN, B.; ZANKER, K.S.; HAN, R. Migration and metalloproteinases determine the invasive potential of mouse melanoma cells, but not melanin and telomerase. **Cancer Lett.**, v.162, p.49-55, 2001.

ZITVOGEL, L.; APETOH, L.; GHIRINGHELLI, F.; KROEMER, G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v.8, p.59-73, 2008.

ZWART, L. L. ; MEERMAN, J. H. N.; COMMANDEUR, J. N. M.; VERMEULEN, N. P. E. Free Radical. **Biol. Med.** v.26, 1999.